

TESIS DOCTORAL

*EPIDEMIOLOGIA DE LA
LEISHMANIOSIS CANINA EN LA
CIUDAD DE POSADAS, MISIONES,
ARGENTINA*



LUCRECIA ACOSTA SOTO
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE
SAN JUAN, ALICANTE, 2013

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA, HISTORIA DE LA CIENCIA Y GINECOLOGÍA
PROGRAMA DE DOCTORADO en SALUD PÚBLICA



TESIS DOCTORAL

**EPIDEMIOLOGÍA DE LA LEISHMANIOSIS
CANINA EN LA CIUDAD DE POSADAS,
MISIONES, ARGENTINA.**

LUCRECIA ACOSTA SOTO

Directores:

Dr. Israel Cruz Mata

Dr. Fernando Jorge Bornay LLinares

San Juan de Alicante, 18 de abril de 2013





D. Ildfonso Hernández Aguado, Catedrático de Medicina Preventiva y Salud Pública y Director del Departamento de Salud Pública, Historia de la Ciencia y Ginecología de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICA:

Que **D^a Lucrecia Acosta Soto** ha realizado bajo la coordinación de este Departamento su memoria de tesis doctoral titulada “**Epidemiología de la leishmaniosis canina en la ciudad de Posadas, Misiones, Argentina**”, bajo la dirección de los doctores D. Israel Cruz Mata y D. Fernando Jorge Bornay Linares, cumpliendo todos los objetivos previstos, finalizando su trabajo en forma satisfactoria para su defensa pública y capacitándole para optar al grado de doctora.

Sant Joan d'Alacant, 18 de abril de 2013

Fdo: Dr. Ildfonso Hernández Aguado
Director del Departamento



DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA, HISTORIA DE LA CIENCIA Y GINECOLOGIA
Campus de San Juan. Ctra. de Valencia (N-332), Km. 87 – 03550 Sant Joan d'Alacant
Telf.: 96 591 95 06 – Fax: 96 591 95 51
c.electrónico: salud.pub1@umh.es
Web: <http://www.dsp.umh.es>

Los Doctores,

Dr. Israel Cruz Mata, Científico Titular de la Unidad de Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid.

Dr. Fernando Jorge Bornay Llinares, Profesor Contratado Doctor e Investigador del Departamento de Agroquímica y Medio Ambiente de la Universidad Miguel Hernández de Elche, Alicante.

CERTIFICAN,

Que el presente trabajo de investigación titulado “Epidemiología de la Leishmaniosis Canina, en la ciudad de Posadas, Misiones, Argentina”, presentada por la licenciada en Biología, **Lucrecia Acosta Soto**, ha sido realizado bajo la dirección de ambos y autorizan su presentación para que dicha memoria sea juzgada por el tribunal correspondiente para optar al grado de Doctora por la Universidad Miguel Hernández y dan su conformidad para su presentación y defensa públicas.

San Juan de Alicante, a 18 de abril de 2013.

VºBº Directores

Dr. Israel Cruz Mata

Dr. Fernando Jorge Bornay Llinares

A mis padres

Haz sólo lo que amas
y serás feliz, y el que hace
lo que ama, está condenado
al éxito, que llegará cuando
deba llegar, porque lo que
debe ser será, y llegará
naturalmente.

Facundo Cabral

Agradecimientos

No recuerdo el momento en el que decidí que quería dedicarme a la investigación, creo que lo he querido siempre. Pero si recuerdo perfectamente el día en el que al descubrir el ciclo de *Ascaris lumbricoides*, me dije a mi misma; “Lucre, tú vas a ser parasitóloga”. Y ha llovido mucho desde entonces.

Echando la vista atrás, han sido muchos años y el esfuerzo de mucha gente que tanto directamente como indirectamente han colaborado en la consecución de este trabajo y sin las cuales no habría sido posible realizarlo. Por ello, quiero agradecer a todos ellos cuanto han hecho por mí, y para que este manuscrito viera la luz. Sabed que aunque no mencione a alguien en estas líneas, estáis todos entre ellas.

Dedico este manuscrito a mis padres, ellos son el claro ejemplo de sacrificio y amor incondicional por sus hijos. Algún día espero poder devolveros, al menos, una ínfima parte de todo lo que me habéis dado. Sé que estaríais igualmente orgullosos de mí aunque no lo hubiese conseguido, pero quiero que sepáis que si en algún momento se me pasó por la cabeza desistir, fuisteis la única razón para seguir adelante.

Quiero dar las gracias a mis hermanos Toñi, Marta, Paco, Lola y a toda mi familia, por su apoyo y por estar siempre a mi lado compartiendo mis penas y alegrías. A mi gran ausencia, “mi yaya”, siento mucho que no puedas estar presente, no llegué a tiempo.

A mis directores Israel y Fernando, no sé cómo agradecer la oportunidad que me habéis brindado, por todo lo que he aprendido de vuestra mano aunque soy consciente de que me queda mucho por aprender. Gracias por haber confiado en mí. Nando, parece que fue ayer cuando me paré delante de ti y te dije que quería trabajar contigo. Menos mal que me dijiste que no.

Al igual que esta tesis tiene dos directores, quizás debería tener dos coautoras, gracias Mariana Noel Gutiérrez, por el empeño, sacrificio y profesionalidad mostrados. Por tu calidad humana, porque todas esas incontables horas de duro trabajo, agotamiento y desesperación, se han pasado mejor a tu lado. Porque has dedicado mucho tiempo a este trabajo, a expensas de pasarlas con Beli. A Miguel Ángel y Carmen, al conoceros no me cabe duda de quién ha heredado Mariana todos sus valores. Gracias por nuestras conversaciones, y sobre todo por escuchar, sé que tengo a parte de mi familia al otro lado del charco.

Hay mucho que agradecer a la contraparte de Misiones, tanto al personal del Ministerio de Salud como a los de la UNAM; a Jorge por su dedicación y entrega al trabajo, a los promotores de salud (Miguel, Mónica, Paulo, Diego, David, Francisco, Mario, Noralí, Ana, Ángel, Fabian, Sinecia, Oscar, Marta y Doris), a los conductores (Machado, Peluche y Hugo), y a Ketty a todos ellos por el esfuerzo y profesionalidad mostrados. A los dueños de los perros y responsables de “El Refugio” y “El IMUSA” que colaboraron en la consecución de este trabajo. A Jorge y Graciela, por abrirme las puertas de su casa y acogerme como a una más de la familia. Y en general a toda la gente que he conocido en Misiones que entre asados, facturas, dulce de leche, mates y bailes, han hecho que el trabajo fuese mucho más llevadero y que se me quedara esa tierra colorá “pegada en los zapatos”.

A toda la gente del ISCIII porque desde que crucé sus puertas en el 2006, me dieron la oportunidad de compartir sus conocimientos conmigo y he aprendido muchísimo de todos ellos. A Nuria por su ayuda con los ELISAs, Carmen y Emi, por su esfuerzo con los cultivos. A Javier por sus aportaciones, y ayuda con los IFIs. A María por sus comentarios y por mostrarme otros puntos de enfoque. En

especial a Carmen Cañavate por apoyar este trabajo y acogerme en el grupo de trabajo.

A las chicas del Centro de Cooperación de la UMH; Raquel, Miri y Espe, por todos los trámites del proyecto y viajes.

A Miguel Ángel por proporcionar el mapa, a Manuela, Andrés y a mi "tete" por su ayuda en la edición del mismo. Y como no, a Mariana por todas esas horas punteando los casos.

A todos mis compañeros de "Fontilles" en especial a Pedro Torres, por valorarme, creer en mí y darme la oportunidad de aprender tanto sobre la lepra y sobre mi misma. Porque es un lugar que se puede distinguir por muchas cosas, pero sobre todo, por la calidad humana de la gente. De hecho, gran parte de este manuscrito ha sido escrito al amparo de las paredes de ese maravilloso lugar, y muchos de los conocimientos que he adquirido sobre biología molecular han sido gracias a Fontilles. A Lucy, Ricardo, Carmen, Jose y Yago, sin vosotros mi estancia allí no habría sido igual. Ha significado mucho para mí ver una cara amiga tras estar tantas horas encerrada en el laboratorio, se agradece. Y doy fe de que han sido muchas horas. A Pep, muchas gracias por nuestras conversaciones.

A Lucy, por su ayuda desinteresada en el diseño de los estudios, a Noemí por escuchar mis charlas y a Eva por su positivismo. Chicas, gracias por las horas de evasión que hemos compartido juntas, espero que nuestra amistad dure muchos años.

A Luis, por poner luz en las horas de impaciencia y desesperación en Londres, por tus consejos y ayuda tanto para la redacción del manuscrito como el formato final. Porque siempre estás cuando te necesito.

A mis amigos; Pedro, Miriam, Juanjo y Lola, porque han sido un pilar fundamental para mí, por aguantarme, escucharme, acompañarme, regañarme y sobre todo por quererme. Porque han hecho que tras mis ausencias todo siguiera como si no me hubiese ido. A María y mi Lola, sin vosotras mi estancia en Londres habría sido un suplicio. A "mis chicos", Javi, Miguel y Carlos, por ser mi vía de escape. A mi prima Ana, que espero que no hayas contado las veces que me has acompañado al aeropuerto. A Pili por esos domingos de "gabinete de crisis". A Olga, por todos estos años que me has escuchado, animado y apoyado. A Sergio, gracias por preocuparte siempre, y darme tantos ánimos.

A Davinia, doy gracias por ese revés de vida que reafirmó nuestra amistad y nos unió, gracias porque no hay semana que no te preocupes por mí, y muchas más gracias por esa portada tan estupenda que has diseñado. Y a Jose Juan, por su ayuda con el maquetado y la impresión.

Llegado a este punto, a Javier ya le ha dado un ataque de ver lo que había escrito sobre él. He sido un poco mala lo reconozco, pero quería agradecerte particularmente tu implicación en todo este trabajo. Por todo lo que he aprendido de tu experiencia en leishmaniosis canina, y en otras cosas. Por tus consejos, tu preocupación por mí y como no, por tu compañía en los viajes. Pues no nos hemos reído ni "ná".

Finalmente, y no por ello menos importante, quiero agradecer a Guillermo sus consejos y regañinas. Quiero que sepas que aunque creas que no te escucho, lo hago y medito sobre lo que me dices. De tu mano he aprendido muchísimo. Y además, eres una de las pocas personas a las que hago caso aunque tengamos nuestros más y nuestros menos. El que te sientas orgulloso de mí ha sido uno de los motores en la redacción de este manuscrito.

Resumen

La leishmaniosis visceral (LV) es una de las enfermedades parasitarias más importantes a nivel mundial. En zonas endémicas de leishmaniosis visceral zoonótica (LVZ), los perros son considerados el reservorio más importante y las altas prevalencias de leishmaniosis canina (LCan) se encuentran asociadas con la transmisión de la infección a humanos.

Ante la emergencia de LV humana en la ciudad de Posadas en 2006, se planteó un primer estudio a fin de determinar la implicación de los perros como reservorio de LVZ en este contexto; así como, en caso afirmativo, caracterizar molecularmente la especie o especies encontradas en los mismos. La infección por *Leishmania* fue confirmada por métodos parasitológicos directos y/o indirectos en 63 (57,3%) de los 110 perros estudiados y se identificó a *L. infantum* como única especie implicada.

Posteriormente, se diseñó un segundo estudio, con el objetivo de determinar la prevalencia e incidencia acumulada (IA) de la infección por *L. infantum*, en los perros domésticos de la ciudad de Posadas, e investigar posibles factores de riesgo asociados a la infección por *L. infantum* en estos canes. Para estudiar la prevalencia de la infección se llevó a cabo un muestreo aleatorio simple (MAS), y esta resultó del 22,3% (78/349) (17,6%-27,8%). La georreferenciación de los perros examinados, permitió observar un patrón de distribución homogéneo de los perros infectados en la ciudad. Los canes asintomáticos infectados representaron en este estudio el 55,1% (43/78) del total de infectados, pudiendo jugar un papel importante en la transmisión natural de la infección. Se observó un mayor riesgo en la adquisición de la infección por *Leishmania* en los perros que duermen fuera de la casa. La IA en los perros que resultaron negativos a la infección por *Leishmania* al año del MAS resultó del 10,5% (4,7%-16,3%), y mostró el mismo patrón de distribución espacial. Se observa que en el estudio de IA el porcentaje de perros asintomáticos positivos 3/13 (23,1%), es mucho más bajo que el observado en el estudio de prevalencia (43/78, 55,1%). Los resultados de los métodos parasitológicos directos e indirectos empleados para determinar la infección por *L. infantum* en la población canina de la ciudad de Posadas, resultaron concordantes; y se observó que la sintomatología relacionada con LCan en los perros domésticos es inespecífica, ya que el 75,9% (110/145) de los perros sintomáticos no se encontraban infectados.

Por último, se compararon los resultados de los métodos parasitológicos directos e indirectos en dos poblaciones caninas diferentes, para determinar el grado de asociación entre las variables estudiadas y la infección por *Leishmania* en un ejemplo

de población dispersa (MAS en perros domésticos de la ciudad) vs población hacinada (perros de la protectora de animales "El Refugio). Así como describir en ambos contextos epidemiológicos la distribución de los canes expuestos e infectados en relación a los signos clínicos presentados y a los resultados de las pruebas diagnósticas. Además, se analizó la variabilidad genética de los minicírculos del kDNA de *L. infantum* en los perros parasitológicamente positivos de ambas poblaciones. Los resultados mostraron que las poblaciones hacinadas poseen mayores prevalencias de infección por *Leishmania* que las dispersas (45,7% vs 22,3%). Y, por tanto, no serían apropiadas para estimar la prevalencia/incidencia real de la infección en la ciudad. La variabilidad genética de *L. infantum* en los perros de la ciudad de Posadas resultó ser escasa, identificándose únicamente dos genotipos. En vista de los resultados la LVZ en la ciudad de Posadas se encuentra bien establecida y podría tratarse de un foco de reciente introducción. El conocimiento aportado a la epidemiología de la infección por *L. infantum* en los canes de la ciudad de Posadas, debe contribuir al establecimiento de medidas de prevención y control de la enfermedad tanto en canes como en humanos.

Abstract

Visceral leishmaniasis (VL) is one of the most important parasitic diseases in the world. The domestic dog is the main reservoir in urban environments where VL is zoonotic (ZVL) and a high prevalence of canine leishmaniasis (CanL) is associated with transmission of infection to humans.

Due to the emergence of human VL in the city of Posadas in 2006, a first study was carried out to determine whether dogs were the reservoir for ZVL in this context, and if so, to carry out molecular characterization of the species found. *Leishmania* infection was confirmed in 63 (57.3%) of 110 sampled dogs by direct and/or indirect parasitological methods and *L. infantum* was the specie implicated in all positives dogs. Subsequently, a second study was designed, in order to estimate the prevalence and cumulative incidence (CI) of *Leishmania* infection in Posadas, using a representative sample of domestic dogs, and to identify variables related to infection susceptibility. The estimated prevalence of *Leishmania* infection in the dogs of the city of Posadas was 22.3% (78/349) (17.6%-27.8%). The geo-reference of positives dogs showed a homogenous distribution pattern in the city. In this study, positive asymptomatic dogs represented the 55.1% (43/78) of infected dogs, which can play an important role in the natural transmission of the infection. An increased risk in the acquisition of *Leishmania* infection was observed in dogs that sleep outside the house. However, 55.1% (43/78) of the positive dogs did not exhibit any clinical signs compatible with CanL and thus can be considered asymptomatic carriers. The observed cumulative incidence was 10.5% (4.7% - 16.3%) in one year and showed the same homogeneous pattern of spatial distribution. The percentage of asymptomatic positive dogs 3/13 (23.1%) observed in the cumulative incidence study was lower than in the prevalence study (43/78, 55.1%). The parasitological methods of diagnosis of CanL were consistent and it was noted that the symptoms related to CanL in domestic dogs are non-specific because the 75.9% (110/145) of symptomatic dogs in our sample from the city of Posadas were not infected.

Finally, the parasitological direct and indirect methods of diagnosis were compared in two epidemiologically different populations; dispersed population (domestic dogs) vs overcrowded population (shelter dogs) to determine the degree of association between the studied variables and infection by *Leishmania*. We also sought to describe the distribution of dogs that were exposed or infected in relation to clinical signs presented, and the results of diagnostic tests in both epidemiological contexts. On the other hand, the genetic variability in the kDNAminicircles of *L. infantum* in positive dogs of both populations was analyzed. The results showed that overcrowded

populations have higher prevalence of *Leishmania* infection than scattered (45.7% vs. 22.3%), and they are not appropriate to estimate the real prevalence or cumulated incidence of *Leishmania* infection. In the city of Posadas, the *L. infantum* gene heterogeneity in dogs showed two different patterns, indicating a low genetic variability.

The results suggest, this endemic focus of disease could be well established, constituting a substantial risk to the human population. Understanding the epidemiology of CanL infection in endemic areas is essential for the development of prevention strategies to address both human and canine disease.

ÍNDICE



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LEISHMANIOSIS: CONCEPTO.....	3
1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS LEISHMANIOSIS HUMANAS.....	3
1.3. ETIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN.....	4
1.3.1. El parásito.....	4
1.3.1.1. Formas clínicas de las leishmaniosis humanas.....	7
1.3.2. El vector.....	10
1.3.3. Reservorios.....	11
1.3.4. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	13
1.3.4.1. Transmisión no vectorial	14
1.4. LEISHMANIOSIS VISCERAL ZONÓTICA (LVZ) EN AMÉRICA LATINA.....	15
1.5. LEISHMANIOSIS CANINA.....	22
1.5.1. Patogénesis y respuesta inmune.....	24
1.5.2. Alteraciones clínico-patológicas.....	28
1.5.3. Diagnóstico de Leishmaniosis canina.....	29
1.5.3.1. Anamnesis.....	30
1.5.3.2. Diagnóstico de laboratorio.....	30
1.5.3.2.1. Métodos directos.....	30
1.5.3.2.1. Examinación microscópica.....	31
1.5.3.2.2. Cultivo.....	31
1.5.3.2.3. Reacción en cadena por la polimerasa (PCR).....	32
1.5.3.2.4. PCR a tiempo real (RT-PCR).....	32
1.5.3.2.2. Métodos indirectos.....	33
1.5.3.2.2.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	33
1.5.3.2.2.2. Test de aglutinación directa (DAT).....	34
1.5.3.2.2.3. Enzimoimmunoensayo (ELISA).....	34
1.5.3.2.2.4. Test inmunocromatográfico rápido (ICT)....	36
1.6. CONTROL DE LA LVZ.....	36
1.6.1. Vector	37
1.6.1.1. Control vectorial.....	37

1.6.1.2. Profilaxis.....	38
1.6.2. Hospedador.....	39
1.6.2.1. Control del reservorio canino.....	39
1.6.2.2. Inmunoterapia en el perro.....	40
1.6.3. Parásito.....	43
1.6.3.1. Quimioprofilaxis en el perro.....	43
1.6.3.2. Quimioterapia en el perro.....	43
2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	45
2.1. ANTECEDENTES.....	47
2.2. JUSTIFICACIÓN.....	49
3. OBJETIVOS.....	51
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	53
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
4. ESTUDIOS EXPERIMENTALES.....	55
4.1. ESTUDIO 1. LEISHMANIOSIS CANINA EN LA CIUDAD DE POSADAS: ESTUDIO PILOTO.....	57
4.1.1. Objetivos.....	59
4.1.2. Material y métodos.....	59
4.1.3. Resultados.....	63
4.1.4. Discusión.....	67
4.2. ESTUDIO 2. PREVALENCIA E INCIDENCIA ACUMULADA DE LEISHMANIOSIS CANINA EN LA CIUDAD DE POSADAS.....	71
4.2.1. Objetivos.....	73
4.2.2. Material y métodos.....	73
4.2.3. Resultados.....	80
4.2.4. Discusión.....	94
4.3. ESTUDIO 3. COMPARACIÓN DE DOS ESCENARIOS EPIDEMIOLÓGICAMENTE DIFERENTES: POBLACIÓN DISPERSA VS POBLACIÓN HACINADA.....	101
4.3.1. Objetivos.....	103
4.3.2. Material y métodos.....	103
4.3.3. Resultados.....	106
4.3.4. Discusión.....	115
5. CONCLUSIONES.....	119

ANEXOS	127
ANEXO I: TRABAJO DE CAMPO.....	127
ANEXO II: MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO INDIRECTO.....	131
ANEXO III: MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DIRECTO.....	143
ANEXO IV: ABREVIATURAS.....	155
ANEXO V: TRABAJOS PUBLICADOS.....	159
BIBLIOGRAFÍA	169

1. INTRODUCCIÓN



1.1. LEISHMANIOSIS: CONCEPTO

Las leishmaniosis engloban a un grupo de enfermedades parasitarias de transmisión vectorial, caracterizadas por su diversidad y complejidad, que afectan tanto al ser humano como a otros vertebrados. Están causadas por diferentes especies de protozoos flagelados del género *Leishmania*, que son transmitidos por picaduras de las hembras hematófagas de alrededor de 93 especies de flebotomos; género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo (África, Asia y Europa), y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (América) (WHO, 2010).

1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS LEISHMANIOSIS HUMANAS

La Organización Mundial de la Salud (OMS) incluye a la leishmaniosis humana en la categoría de enfermedades emergentes y sin control (WHO, 2010), enmarcada dentro del grupo de enfermedades tropicales olvidadas (NTDs: *neglected tropical diseases*) (Brooker y Utzinger, 2007). Actualmente constituye la tercera enfermedad humana más importante de entre las transmitidas por vectores, después de la malaria y filariasis linfática, y la novena enfermedad infecciosa más grave a nivel mundial. (Chappuis y col., 2007; Bern y col., 2008). Es mundialmente reconocida como una de las enfermedades infecciosas más importantes que afectan a la población pobre en áreas rurales y suburbanas, debido a su asociación con la pobreza y a la escasez de recursos disponibles en materias de tratamiento, diagnóstico y control (Alvar y col., 2006).

Las Leishmaniosis son endémicas en 98 países o territorios, 72 de los cuales se encuentran en vías de desarrollo, y se estima que más de 350 millones de personas están viviendo en zonas de riesgo de infección (WHO, 2010). Se estima que la prevalencia es de 12 millones de casos, con una incidencia de 2 millones de casos nuevos por año, de los cuales 1,5 millones son de leishmaniosis cutánea (LC) y 0,5 millones de leishmaniosis visceral (LV), que es la forma más grave y frecuentemente mortal si no es tratada (Desjeux, 2004; Reithinger y col., 2007). En total se cobra 2.357.000 años de vida ajustados por discapacidad y unas 20.000 a 40.000 muertes anuales (Alvar y col., 2012). El 90 % de los casos de LC se concentran en Afganistán, Pakistán, Irán, Arabia Saudí, Argelia, Siria, Brasil y Perú, mientras que más del 90 % de los casos de LV ocurren en Bangladesh, Brasil, India, Nepal y Sudán (Alvar y col., 2012). El 90% de las leishmaniosis mucocutáneas (LMC) tiene lugar en Bolivia, Brasil y Perú. (Desjeux, 2004) (ver figura 1.1). No obstante, la verdadera extensión de la enfermedad podría ser todavía mayor, ya que la declaración oficial de la leishmaniosis

sólo es obligatoria en un tercio de los países afectados y una parte sustancial de los casos nunca queda registrada (WHO, 2002; Hotez y col., 2008).

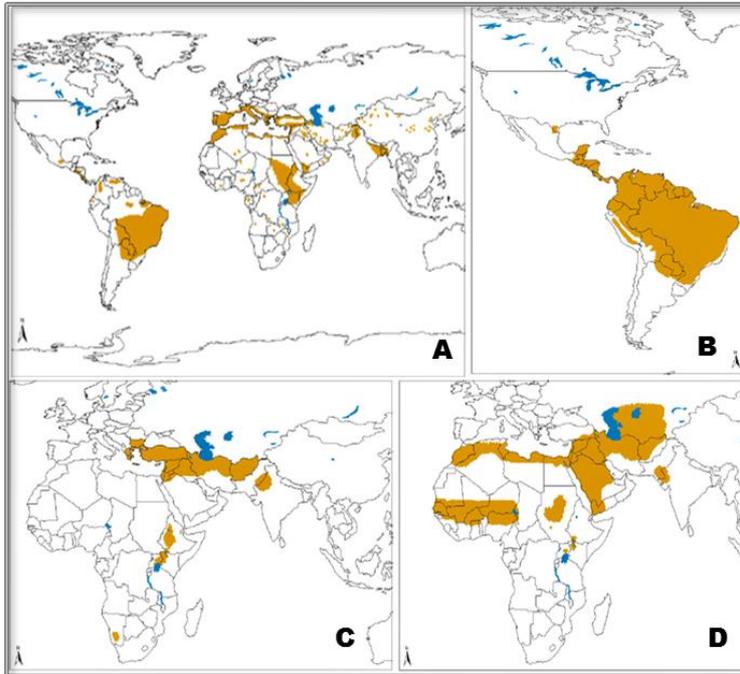


Figura 1.1. A: Distribución de la LV humana. **B:** Distribución de LC y LMC en el Nuevo Mundo. **C:** Distribución de la LC humana causada por *Leishmania tropica* y *Leishmania aethiopica* en el Viejo Mundo. **D:** Distribución de LC humana causada por *Leishmania major* en el Viejo Mundo

(http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/).

1.3. ETIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN

1.3.1. EL PARÁSITO

El género *Leishmania* está compuesto por protozoos flagelados pertenecientes a la familia Trypanosomatidae, orden Trypanosomatida, clase Kinetoplastida. Este parásito fue descrito en 1903 por primera vez y simultáneamente por Leishman y Donovan en enfermos de la India (Ross, 1903), y por Wright (Wright, 1903) en un niño armenio. El género *Leishmania* (Ross, 1903), incluye más de dos docenas de especies morfológicamente indistinguibles, que pueden ser diferenciadas por análisis isoenzimáticos, métodos moleculares, o anticuerpos monoclonales. Contienen una única mitocondria que alberga al kinetoplasto, que es una estructura especial rica en ADN que se sitúa en las proximidades del cuerpo basal del flagelo. Actualmente se acepta la clasificación propuesta por Cavalier-Smith (1998).

Dominio Eukariota
Reino Protozoa
Subreino Biciliata
Infrareino Excavata
Filo Euglenozoa
Subfilo Saccostoma
Clase Kinetoplastida
Orden Trypanosomatida
Familia Trypanosomatidae
Género *Leishmania*

Tabla 1.1. . Posición taxonómica del género *Leishmania* (Cavalier-Smith, 1998).

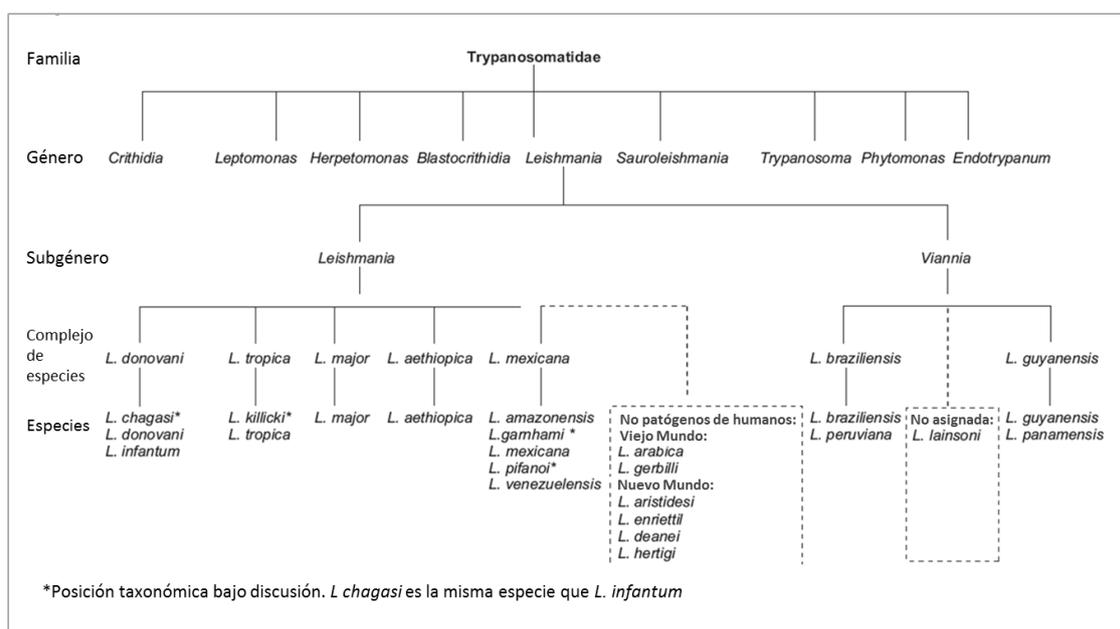


Figura 1.2. Taxonomía de *Leishmania* spp.* Mauricio y col., 2000 (Adaptado de WHO, 2010).

Las especies de *Leishmania* están adaptadas a condiciones ambientales variables y heterogéneas tanto en el hospedador vertebrado como en el vector invertebrado (Sharma y Singh, 2008). Esta rápida adaptación a las condiciones cambiantes se debe a la habilidad del parásito para modular su expresión génica, probablemente asociada a la expresión de genes específicos localizados en regiones repetidas en tándem (Singh y col., 2005).

Morfología

Leishmania es un parásito digénico que presenta dos morfologías a lo largo de su ciclo biológico: una intracelular o amastigote (cuerpo de Leishman-Donovan) en las células del sistema retículo-endotelial del hospedador vertebrado y una forma extracelular o promastigote en el hospedador invertebrado o en cultivos "in vitro".

El amastigote es inmóvil, de forma ovalada y con un tamaño de 3-5 μm x 1,5-2,5 μm . En el citoplasma se observa un núcleo esférico, voluminoso, generalmente excéntrico y un kinetoplasto próximo al núcleo de aspecto bacilar (Chang, 1956; González y col., 1976).

El promastigote es fusiforme, extracelular y móvil. Es de mayor tamaño que el amastigote (10-30 μm de largo y 1,5-3 μm de ancho). Posee un largo flagelo libre en la región anterior, un núcleo ovalado situado en la región central y un kinetoplasto bastoniforme (Chang, 1956; González y col., 1976; Dedet y col., 1999).

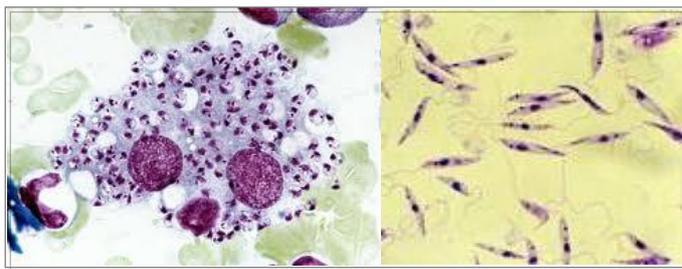


Figura 1.3. Tinción con Giemsa de **A)** Amastigotes de *Leishmania* spp. (<http://cvbd.org>). **B)** Promastigotes de *Leishmania* spp. (<http://fundacionio.org>).

Organización genómica

Los protozoos pertenecientes al orden Kinetoplastida presentan un ADN nuclear (ADNn) que se encarga de la multiplicación del parásito, y un ADN extracromosómico situado en la única mitocondria que se divide independientemente, llamado ADN del kinetoplasto (ADNk) (Simpson y da Silva, 1971). El tamaño del genoma de *Leishmania* (en su versión haploide) varía con las especies, pero aproximadamente posee unos 3.5×10^7 pares de bases (pb) (Galindo y Ramírez, 1989), siendo el ADNn más del 80% del total (Lighthall y Giannini, 1992).

Tradicionalmente se ha aceptado que es un parásito asexual con replicación clonal y sin intercambio genético, con un cariotipo constituido por 34 a 36 cromosomas (Alvar, 2001). Aunque recientemente se ha demostrado la existencia de cierto intercambio genético tanto intra como interespecífico (Sadlova y col., 2011).

1.3.1.1. FORMAS CLÍNICAS DE LAS LEISHMANIOSIS HUMANAS

Las manifestaciones clínicas de la infección por *Leishmania* en humanos son muy diversas en cuanto a forma y severidad, y van a depender de la interacción entre la especie de parásito que la causa y el sistema inmune del hospedador (Herwaldt, 1999; Murray y col., 2005). Esta variabilidad en la expresión de la enfermedad en humanos también se ha demostrado en animales infectados naturalmente y, especialmente, en animales infectados experimentalmente (Alvar y col., 2004; McMahon-Pratt y Alexander, 2004). Clínicamente la enfermedad se puede agrupar en dos manifestaciones principales: **Leishmaniosis cutánea (LC)** y **Leishmaniosis visceral (LV)** o **Kala-azar**, si bien hay una serie de evoluciones tórpidas que conducen a otros cuadros clínicos: **Leishmaniosis cutánea recidivante (LCR)**; **Leishmaniosis cutánea difusa (LCD)**, **Leishmaniosis mucocutánea (LMC)** y **Leishmaniosis dérmica post-kala-azar (LDPK)**.

Sin embargo, todas las presentaciones asociadas a la infección por *Leishmania* comparten tres características comunes: i) macrófagos residentes en los tejidos infectados con multiplicación intracelular del parásito; ii) respuesta inmunoinflamatoria del hospedador que regula la expresión y resultado de la enfermedad; y iii) persistencia de la infección tisular. (Zwingenberger y col., 1990; Zambrano-Villa y col., 2002; Awasthi y col., 2004; Liese y col., 2008). Entre el 80 y el 90 % de las infecciones humanas cursan de manera subclínica o asintomática (Badaró y col., 1986; Albrecht, 1998).

La **Leishmaniosis cutánea (LC)**, también se denomina “botón de oriente” (cuenca Mediterránea), “uta” (Perú), “ulcera de los chicleros (México), o “pian bois” (Guayana). Comienza generalmente con una pápula localizada en la zona de inoculación de los promastigotes, que se convierte en un nódulo y que se puede ulcerar en 1 a 3 meses (Dowlati, 1996; Machado y col., 2002; Magill, 2005). Las lesiones aparecen principalmente en cara, brazos y piernas, pudiendo curar espontáneamente en un tiempo comprendido



Figura 1.4. LC (<http://who.int>).

entre dos meses y un año. Sin embargo, si ocurren sobreinfecciones secundarias, estas pueden evolucionar a lesiones desfigurantes que dejan marcas permanentes en la piel y originan una grave discapacidad (Roberts y Janovi, 1995; Hepburn, 2003). Esta manifestación la originan unas 17 especies diferentes de *Leishmania* en todo el mundo, principalmente *L. major*, *L. tropica*, y *L. aethiopica* (denominadas comunmente como LC del Viejo Mundo); *L. infantum* (Regiones del Mediterráneo, Mar Caspio y

América Latina); y *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, y *L. guyanensis* (LC del Nuevo Mundo) (Reithinger y col., 2007).

La **Leishmaniosis cutánea difusa** (LCD) está caracterizada por lesiones diseminadas lepromatosas o acneiformes que no se ulceran, y que se asocian a estados inmunes anérgicos frente a *Leishmania* (Barral y col., 1995). Es causada por las especies *L. aethiopica* en el Viejo Mundo y por *L. amazonensis* en el Nuevo Mundo. No cura de manera espontánea por lo que precisa tratamiento específico, aunque éste es poco efectivo, produciendo un curso clínico crónico.



Figura 1.5. LCD
(<http://piel-l.org>).

La **Leishmaniosis cutánea Recidivante** (LCR), es una forma cutánea crónica debida generalmente a *L. tropica*, aunque raramente, también ha sido descrita en el Nuevo Mundo causada por las especies del subgénero *Viannia* (Oliveira-Neto y col., 1998; Calvopina y col., 2006), y por *L. amazonensis* (Bittencourt y col., 1993). Son lesiones vesiculares y/o papulares que aparecen después de la cura clínica, crecen y tienden a curar en el centro, pudiendo aparecer nuevas pápulas alrededor de la lesión principal, que persisten durante varios años.



Figura 1.6. LCR
(<http://facmed.unam.mx>).

La **Leishmaniosis mucocutánea** (LMC) es denominada comúnmente como “espundia”. A partir de una lesión cutánea primaria, puede haber diseminación metastásica del parásito a las mucosas que conlleva a la destrucción del cartílago y tejidos blandos (Roberts y Janovi, 1995; Hepburn, 2003). Comienza con eritema y ulceraciones en los orificios nasales, causando destrucción progresiva de la cavidad oronasal (“nariz de tapir”) pudiendo producir una desfiguración notable.



Figura 1.7. LMC
(<http://piel-l.org>).

Inicialmente se observan lesiones inflamatorias destructivas con posterior necrosis de los labios, nariz, paladar blando y cuerdas vocales que pueden obstruir la faringe o laringe (Franke y col., 1994). Aunque está relacionada con las especies de *Leishmania* que causan LC en el Nuevo Mundo (*L. braziliensis*, *L. panamensis*, y *L. guyanensis* principalmente) y *L. tropica* en el Viejo Mundo, también hay descripciones esporádicas por *L. donovani*, *L. major* (Reithinger y col., 2007) y en pacientes inmunocomprometidos por *L. infantum* (Murray y col., 2005).

La **Leishmaniosis visceral** (LV) es una enfermedad crónica causada por el complejo de especies *L. donovani*, con una tasa de mortalidad del 75-95% si no es tratada. *L. donovani* es la especie causante de Leishmaniosis visceral antroponótica (LVA) o “Kala-azar” en el Subcontinente Indio, y África oriental (tanto en adultos como en niños).



Figura 1.8. LV (<http://scienphoto.com>; <http://who.int>).

L. infantum, causa la llamada Leishmaniosis visceral zoonótica (LVZ) en la cuenca Mediterránea, norte de África, Oriente Medio, Asia central, China y América Latina.

Aunque otras especies pueden ser ocasionalmente viscerotrópicas (*L. trópica*, *L. amazonensis* o *L. braziliensis*) (Guerin y col., 2002).

La diferencia entre LVA y LVZ se debe a que epidemiológicamente se pueden diferenciar dos tipos de ciclos considerando la presencia o no de reservorios animales. La LVZ se caracteriza por presentar un ciclo zoonótico donde juegan un papel importante reservorios mamíferos, tanto domésticos (el perro principalmente) como silvestres (otros cánidos y roedores). En cambio, en la LVA el humano se comporta como reservorio principal de la enfermedad.

El parásito infecta principalmente a los macrófagos de órganos hematopoyéticos (hígado, bazo y médula ósea), causando graves disfunciones orgánicas. Resulta una infección generalizada del sistema retículoendotelial con episodios irregulares de fiebre, pérdida sustancial de peso, anemia, hepatomegalia, y esplenomegalia. Leucopenia, trombocitopenia e hipergammaglobulinemia también son características. Pudiéndose observar en los casos más avanzados caquexia, fallo multisistémico, hemorragia derivada de la trombocitopenia, susceptibilidad a infecciones secundarias, y muerte. (Herwaldt, 1999; Solbach y Laskay, 2000; Desjeux, 2001 y 2004). Cabe destacar que todos los agentes causales de LV pueden dar lugar también a manifestaciones cutáneas.

La **Leishmaniosis dérmica post-kala-azar** (LDPK) se presenta principalmente en el subcontinente Indio y el este de África. Se trata de una complicación de la infección causada por *L. donovani*. En algunos pacientes, meses o años después de un kala-azar, aparentemente curado, aparece un cuadro de erupciones hipopigmentadas maculares, maculopapulares o nodulares alrededor de la boca que posteriormente se generalizan (Zijlstra y col., 2003).



Figura 1.9. LDPK (<http://who.int>).

En Sudán, aproximadamente en la mitad de los pacientes la LDPK se manifiesta en menos de 6 meses desde el episodio de LV, pero cura espontáneamente en menos de 12 meses y generalmente no necesita tratamiento adicional. Sin embargo en India, se desarrolla en el 5-10% de los pacientes, años después de un tratamiento aparentemente exitoso para LV, no cura y necesita tratamiento. Este tipo de pacientes se consideran de riesgo epidemiológico por su actuación como reservorios de la enfermedad.

1.3.2. EL VECTOR

Los vectores de las leishmaniosis son dípteros nematoceros pertenecientes a la familia Psychodidae, subfamilia Phlebotominae (Killick-Kendrick, 1999). La identificación de los flebotominos como vectores fue llevada a cabo por primera vez por Adler y Theodor en 1925 (Adler y Theodor, 1932). Se conocen más de 800 especies pertenecientes a esta subfamilia repartidas por todo el mundo (Munstermann, 2005), de ellas sólo unas 93 son vectores probados o sospechosos de transmitir el parásito (WHO, 2010). Las especies que actúan como vectores de *Leishmania* están restringidas a dos géneros: *Phlebotomus* en Europa, África y Asia y *Lutzomyia* en el continente americano desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina (Munstermann, 2005; Reithinger y col., 2007).

Filo Arthropoda
Familia Psychodidae
Subfamilia Phlebotominae
Clase Insecta
Orden Diptera
Género *Phlebotomus* spp.
Lutzomyia spp.

Tabla 1.2. Taxonomía de flebotominos (Kalra, 1988).



Figura 1.10. A) Hembra adulta de *Phlebotomus argentipes*. B) Hembra adulta de *Lutzomyia longipalpis* (Sharma y Singh., 2008).

Los flebotomos se alimentan principalmente al atardecer, y tienden a permanecer cerca de su área de cría, que no suele ser muy elevada del suelo. Se alimentan de azúcares vegetales, sólo las hembras de la especie son hematófagas pues necesitan la ingesta de sangre para madurar la puesta (Killick-Kendrick, 1999). Las diferentes especies tienen diferentes patrones de alimentación y descanso. Pueden volar distancias desde 200 a 2.500 m, y poseen fototropismo positivo. La actividad de los adultos es principalmente crepuscular y nocturna, son activos durante todo el año en zonas tropicales, mientras que en regiones más templadas sólo son activos en las estaciones más suaves. El rango de temperatura que determina esta actividad oscila aproximadamente entre los 15 a 28°C, siempre asociado con una elevada humedad relativa y ausencia de viento o lluvia (Killick-Kendrick, 1999; Sharma y Singh, 2008).

Algunas especies de flebotomos sólo transmiten una especie de *Leishmania*, mientras que otras pueden transmitir varias especies. Debido a la especificidad en la actividad enzimática y ligandos presentes en el intestino del insecto, las especies de *Leishmania* podrán ser capaces de dirigirse a la porción anterior del aparato digestivo, o por el contrario serán excretadas con el resto de la sangre digerida (Volf y col., 2008). Como consecuencia de ello, la transmisión natural de *Leishmania*, solo ocurre en lugares donde estén presentes las especies de vectores competentes (Killick-Kendrick, 1999; Volf y col., 2008). La supervivencia del parásito durante las épocas en las que no existe transmisión vectorial, es sostenida en los hospedadores vertebrados susceptibles, ya que no se ha observado transmisión transovárica de *Leishmania* en los flebotomos vectores. (Bates, 2007).

Otros insectos han sido evaluados como vectores potenciales de *Leishmania*, como pulgas (*Ctenocephalides felis*) (Ferreira y col., 2009) y garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) (Coutinho y col., 2005; Coutinho y Linardi, 2007) pero no se han encontrado evidencias de la transmisión natural del protozoo por éstos (Coutinho y col., 2005).

1.3.3. RESERVORIOS

Se define como reservorio de una enfermedad a aquel animal que garantiza tanto la existencia del agente etiológico como su posterior transmisión (WHO, 1984). Por regla general, en las leishmaniosis zoonóticas existe un ciclo selvático mantenido entre un reservorio salvaje y los flebotomos del entorno. Por sinantropía, bien del reservorio o del vector, el ciclo se aproxima al ámbito peridoméstico para finalmente arraigarse entre los animales y vectores domésticos. El humano se infecta

normalmente de manera accidental bien al penetrar en el ciclo selvático por condicionantes de la vivienda o de su actividad, o al implantarse un ciclo peridoméstico o doméstico. Se han descrito reservorios accidentales que son un fondo de saco para el parásito y carecen de significación epidemiológica.

Los reservorios de las leishmaniosis zoonóticas pertenecen taxonómicamente a varios órdenes:

En el orden **Carnivora** los perros domésticos (*Canis familiaris*) son los principales reservorios, debido al elevado número de individuos presentes en el nicho ecológico y a su estrecha relación con el ser humano (Alvar y col., 2004; 2006; Gramiccia y Gradoni, 2005; WHO, 2010). El ciclo selvático, es mantenido principalmente por cánidos silvestres como el zorro (*Vulpes* spp), zorro cangrejero (*Cerdocyon thous*), lobo (*Canis lupus*), chacal (*Canis aureus*) o el mapache (*Nyctereutes procyonoides*) (Abranches y col., 1983; Gramiccia y Gradoni, 2005; Sobrino y col., 2008; WHO, 2010). Aunque también han sido descritos otros carnívoros silvestres como el linco, mangosta, gineta, y hurón (Sobrino y col., 2008). El cercoletto (*Potos flavus*), el coatí rojo (*Nasua nasua*) y el olingo (*Bassaricyon gabbii*) se han encontrado infectados ocasionalmente (WHO, 2010).

Dentro del orden **Rodentia** se ha descrito el papel de reservorio en varias especies, como el jerbo gigante de las estepas centroasiáticas (*Rhombomys opimus*), la rata de los arenales del norte de Africa y Oriente Medio (*Psammomys obesus*), la rata trepadora centroamericana (*Otodylomys phyllotis*) y otros roedores de los géneros *Oryzomys*, *Dasyprocta*, *Meriones*, *Mastomys*, *Arvicanthis*, *Akodon*, *Bolomys*, *Nectomys*, *Rattus*, *Tatera*, *Nesokia*, *Heteromys*, *Nyctomys*, *Sigmodon*, *Proechimys* y *Neotoma* (Bettini y col., 1980; Gradoni y col., 1987; Fisa y col., 1999; Morillas, 1985; Papadogiannakis y col., 2010; WHO, 2010).

También se han descrito reservorios en otros órdenes como el **Hyracoidea** (los hyrax de África y Oriente Medio (*Heterohyrax brucei*, *Procavia capensis* y *Dendrohyrax* sp.); el orden **Edentata** (los perezosos de las selvas centro y sudamericanas (*Choelopus didactylus*, *C. hoffmani* y *Bradypus griseus*) (WHO, 2010); y la zarigüeya (*Didelphis marsupialis* y *D. albiventris*) como representante del orden **Marsupialia**, (WHO, 2010); mientras que el oso hormiguero (*Tamandua tetradactyla*) es el único representante del orden **Pilosa** (WHO, 2010).

Es posible que otros animales como distintos félidos (Martín-Sánchez y col., 2007, Poli y col., 2002; Maroli y col., 2007), equinos (Fernandez- Belón, 2006) cerdos (Moraes-Silva y col., 2006), gallinas (Alexander y col., 2002), vacas (Lobsiger y col., 2010), ovejas y cabras (Fisa y col., 1999), puedan infectarse, pero se desconoce el papel epidemiológico que podrían jugar.

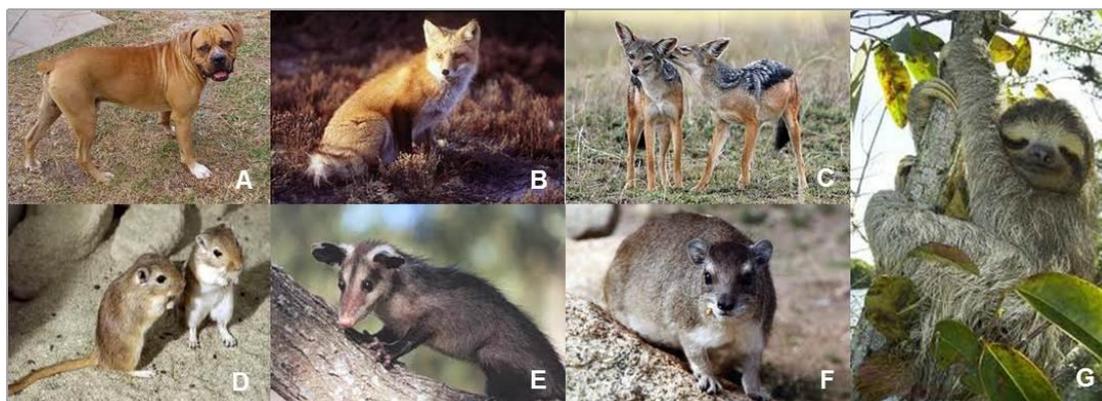


Figura 1.11. A) Perro: *Canis familiaris* (<http://blogdelperro.com>), **B) Zorro:** *Vulpes vulpes* (<http://animales-salvajes.buscamix.com>), **C) Chacal:** *Canis aureus* (<http://waatp.it>), **D) Jerbo:** *Ototylomys phyllotis* (<http://wikifauna.com>), **E) Zarigüeya:** *Didelphis marsupialis* (<http://knowyoursto.com>), **F) Hyrax:** *Heterohyrax brucei* (<http://flickr.com>), **G) Perezoso:** *Bradypus griseus* (<http://scientifictib.com>).

Los seres humanos pueden ser reservorio de la enfermedad en un ciclo antroponótico (Zijlstra y El Hassan, 2001), tanto para LV como LC (WHO, 2010).

1.3.4. CICLO BIOLÓGICO DE *Leishmania*

Se trata de un ciclo diheteroxeno, el cual se completa en dos hospedadores; el insecto vector y el hospedador vertebrado. Cuando el flebotomo pica, toma la sangre del hospedador vertebrado, e ingiere a los macrófagos infectados con los protozoos en forma de amastigote. En el tracto digestivo del vector, los amastigotes se transforman en promastigotes en el intestino medio y grueso (especies peripilóricas del subgénero *Viannia*), o sólo en el intestino medio (especies suprapilóricas del subgénero *Leishmania*) que posteriormente se multiplican y de ahí migran a la probóscide del insecto vector. Tras varios días alcanzan la capacidad infectiva (metaciclogénesis), y se transforman en promastigotes metacíclicos, que serán transmitidos a un nuevo hospedador susceptible en la próxima picadura.

Una vez que el parásito consigue pasar la dermis del hospedador vertebrado, estas formas promastigotes son fagocitadas por macrófagos u otras células fagocíticas mononucleadas. El macrófago rodea a los promastigotes en una vacuola parasitófora (fagosoma) e intenta eliminarlos vertiendo al espacio intravacuolar una cascada de metabolitos derivados del oxígeno, como el óxido nítrico e hidrolasas lisosomales. Pero *Leishmania* es capaz de evadir estas defensas no específicas y multiplicarse en el interior del macrófago, dónde metamorfosea a formas amastigotes (12-24 h) (Sharma y Singh, 2008) que se multiplican por fisión binaria. Estos amastigotes aumentan en número hasta que la célula finalmente estalla, y posteriormente infectan

a otras células fagocíticas. En la naturaleza este estado es crónico, y puede continuar durante meses o años sin la aparición de síntomas o signos clínicos visibles, dependiendo del sistema inmune del hospedador y su susceptibilidad a la enfermedad. En términos generales, en el caso de la leishmaniosis cutánea, los macrófagos infectados se localizarán principalmente en la piel del mamífero hospedador o se diseminarán a otros órganos como ocurre en la leishmaniosis visceral y a mucosas en la leishmaniosis mucocutánea. Sin embargo, dependiendo de la competencia del sistema inmune del hospedador este paradigma puede cambiar.

Los amastigotes circulantes pueden ser ingeridos por otro flebotomo vector, se transformarán en su interior y serán transmitidos a otro hospedador en una nueva picadura; y el ciclo de vida continúa.

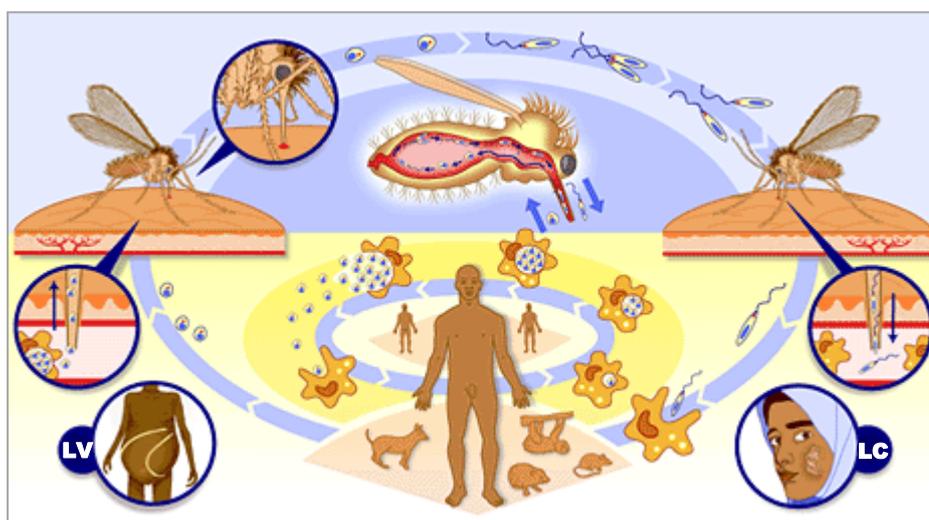


Figura 1.12. Ciclo biológico de *Leishmania* spp. (Adaptado de www.who.int/tdr).

1.3.4.1. TRANSMISIÓN NO VECTORIAL

Los flebotomos son los únicos artrópodos adaptados a la transmisión biológica de *Leishmania*, aunque en ocasiones existe transmisión de *Leishmania* sin la intervención del vector. Sin embargo, se cree que los medios de transmisión no vectoriales juegan un papel marginal en el rol de la historia natural de la leishmaniosis (Baneth y col., 2008).

Aunque la transmisión vertical en perros (transplacentaria o transmamaria) en un principio no se consideraba posible (Andrade y col., 2002), actualmente existen varios trabajos que rebaten esta idea (da Silva y col., 2009; Boggiatto y col., 2011) y ha sido descrita tanto en perros infectados de forma experimental (Rosypal y col., 2005a), como de forma natural (Gibson-Corley y col., 2008). La transmisión vertical es rara pero también posible en humanos (Meinecke y col., 1999).

Por el momento no se analiza de forma rutinaria la presencia de *Leishmania* en los bancos de sangre, pero algunos estudios han detectado el parásito en donantes humanos sanos (le Fichoux y col., 1999; Riera y col., 2004) y se ha reportado la transmisión de la infección a partir de sangre de canes donantes infectados (Owens y col., 2001; de Freitas y col., 2006; Tabar y col., 2008). También se han descrito varios casos de transmisión sanguínea ocurridos de forma accidental en humanos (Shaw, 2007). Igualmente ha sido descrita tanto en canes como en humanos la transmisión venérea (Symmers, 1960; Rosenthal y col., 1988; Silva y col., 2009).

Se ha sugerido la transmisión directa, en ausencia de vectores, entre perros de caza en E.E.U.U., sin embargo, no ha sido confirmada experimentalmente (Duprey y col., 2006). Y también mediante fómites, como en el caso del uso compartido de jeringuillas entre la población toxicómana usuaria de drogas intravenosas (Cruz y col., 2002a).

1.4. LEISHMANIOSIS VISCERAL ZONÓTICA (LVZ) EN AMÉRICA LATINA

En América Latina, *Leishmania infantum* es el agente causal de la LVZ (Lainson y Shaw 1987; Grimaldi y Tesh, 1993), donde las especies del complejo *Lutzomyia longipalpis* son los principales vectores, y el perro es bien reconocido como el principal reservorio en medio urbano (Lanzaro y col., 1993; Ashford, 1996; Soares y Turco, 2003; Alvar y col., 2004). De hecho, se ha observado una asociación espacial entre la ocurrencia de casos caninos y humanos, siendo los casos caninos un precedente para el establecimiento de la infección en humanos en medio urbano (Camargo-Neves y col., 2001; di Lorenzo y Proietti, 2002). En el Nuevo Mundo, se han encontrado más de 40 especies de mamíferos capaces de albergar al parásito. Sin embargo, son pocas las especies que juegan un rol importante como reservorios en la transmisión (Grimaldi y Tesh, 1993). De las 470 especies de flebotominos descritas en esta zona Neotropical, aproximadamente el 10% son vectores probados o sospechosos de transmitir *Leishmania* (Lainson y Shaw, 2005). Siendo *Lu. longipalpis* (Lutz y Neiva, 1912) el vector mejor estudiado (Soares y Turco, 2003; Lainson y Rangel 2005). Este es un vector con gran permisividad, puesto que puede ser infectado con especies como *L. mexicana*, *L. major*, *L. braziliensis* y recientemente se ha sugerido que podría transmitir *L. amazonensis* (Tolezano y col., 2007). En el continente americano, el principal vector de la LV es *Lu. longipalpis*, pero *Lu. evansi* es también un importante vector en Colombia y Venezuela, y *Lu. cruzi* es el vector en la municipalidad de Corumbá, en la frontera de Brasil con Bolivia (OPS/OMS, 2006) y en el estado de Mato Grosso do Sul, Brasil (dos Santos y col., 1998). *Lu. longipalpis* fue

reconocida por primera vez en 1913 (Alencar, 1959). Se postula que es el vector que habría permitido el asentamiento de *L. infantum* en la ecozona Neotropical hace unos 500 años (Lukes y col., 2007). Tradicionalmente se ha considerado que *L. infantum* fue exportada a América Latina por los perros llevados desde Europa durante la colonización (Tuon y col., 2008), adaptándose secundariamente a *Lu. longipalpis* como vector (Killick-Kendrick, 1985; Rioux y col., 1990; Mauricio y col., 2000; Tuon y col., 2008). Un estudio reciente apunta a la introducción múltiple desde el suroeste de Europa (Kuhls y col., 2011) (ver figura 1.13).

Aunque actualmente existe una segunda hipótesis que sostiene la existencia de un ancestro del parásito en América Latina (Lainson y Rangel, 2005; Shaw, 2006).

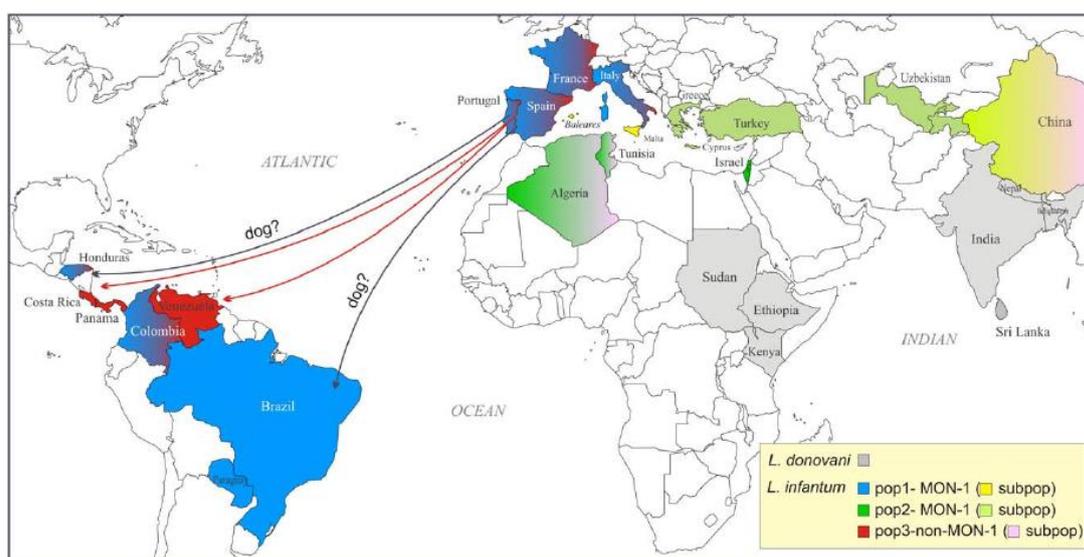


Figura 1.13. Mapa mostrando el posible origen de *L. infantum* en el Nuevo Mundo (Kuhls y col., 2011).

En América Latina se registran alrededor de 64.000 casos de leishmaniosis por año, siendo cerca de 4.000 de LV (OPS/OMS, 2006; Alvar y col., 2012). Hay casos registrados desde el sur de los Estados Unidos (Rosypal y col., 2003a; 2003b), México, hasta el norte de Argentina, incluyendo Brasil, Paraguay, Bolivia, Venezuela, Colombia, Honduras, Panamá, Costa Rica, El Salvador, Guadalupe, Guatemala y Nicaragua, con excepción de Chile y Uruguay (de Leon., 1959; Lainson y col., 1987; Momen y col., 1987; Grimaldi y col., 1989; Duarte y col., 1994; Carrillo y col., 1999; Lainson y Shaw., 2005; OPS/OMS, 2006). Aunque en Uruguay ya se ha encontrado tanto al vector *Lu. Longipalpis* (Salomón y col., 2011) como perros enfermos (Robello, comunicación personal, 2011).

La LVZ en América Latina, afecta principalmente a menores de 9 años, observándose una alta prevalencia particularmente entre los niños de 1 a 4 años de

edad (ver figura 1.14). Afecta especialmente a niños malnutridos, con unas tasas de mortalidad que llegan en algunos lugares al 10%, incluso después del tratamiento (Oliveira y col., 2006; Bern y col., 2008; Albuquerque y col., 2009). Aunque en los últimos años se ha observado un incremento de la prevalencia de la enfermedad en adultos (principalmente hombres e inmunocomprometidos) (ver figura 1.15) (Badaró y col., 1987; Evans y col., 1992; Silva y col., 2001; Oliveira y col., 2006). Los síntomas más frecuentemente observados son, fiebre, hepatoesplenomegalia, anemia y pérdida de peso (Oliveira y col., 2006).

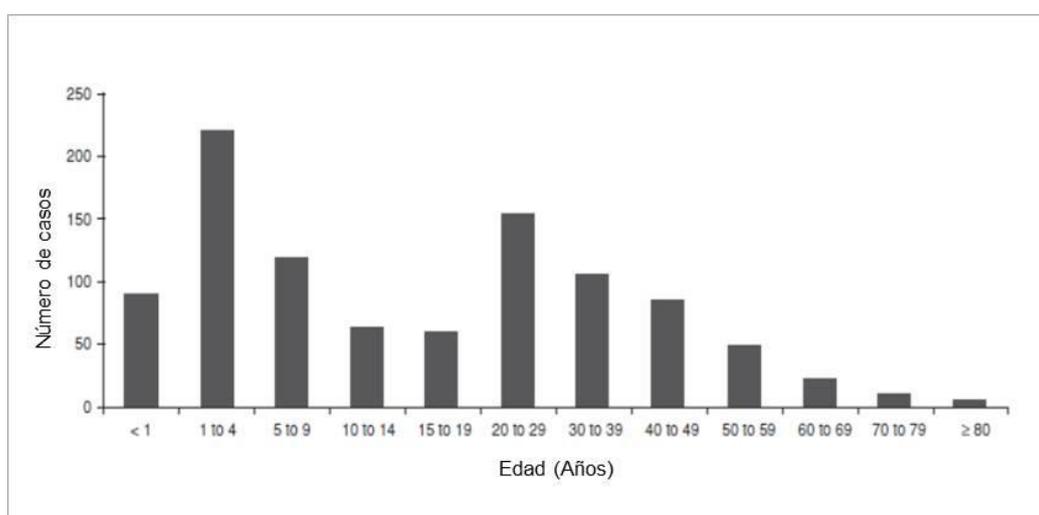


Figura 1.14. Distribución por edad de los casos confirmados de LV en Fortaleza y Ceará (Brasil), desde enero de 2001 a diciembre de 2006 (Adaptado de Albuquerque y col., 2009).

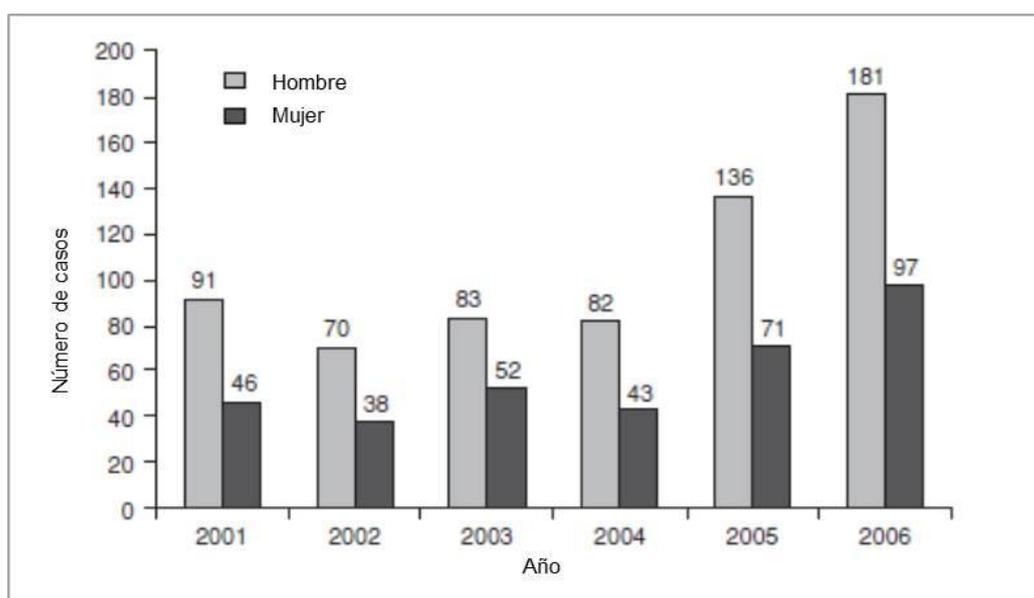


Figura 1.15. Distribución por género de los casos confirmados de LV en Fortaleza y Ceará (Brasil), desde enero de 2001 a diciembre de 2006 (Adaptado de Albuquerque y col., 2009).

La mayoría de las leishmaniosis tradicionalmente han sido consideradas zoonosis rurales o suburbanas, estrechamente ligadas a la pobreza, pero actualmente se encuentran bien establecidas en áreas urbanas (Alvar y col., 2006; Shaw, 2007). Recientemente en toda América Latina, se ha observado un incremento del número de casos de LV tanto en zonas tradicionalmente endémicas, como en nuevas áreas geográficas donde no existía transmisión (Grimaldi y Tesh, 1993; Arias y col., 1996; Ashford, 2000; Shaw, 2007; Salomón y col., 2008; Silva y col., 2008a; 2008b; de Paula y col., 2009).

Brasil representa el 90% de la casuística de LV registrada en las Américas, y el tercer foco registrado a nivel mundial (Brasil Ministério da Saúde, 2006). En los últimos años el 65% de los casos que se registraron en Brasil, tuvo lugar en la región nordeste, principalmente en ámbito urbano y periurbano (Azevedo y col., 2002; OPS/OMS, 2006). Entre 200 a 300 brasileños mueren anualmente por LV (Costa, 2008). A principios de los años 80, la LVZ pasó de ser una enfermedad típicamente rural a causar una serie de epidemias urbanas en el nordeste del país que comenzaron en la ciudad de Teresina (Piauí) (Costa y col., 1990) y siguió a otras ciudades como São Luís (Maranhão), Natal (Rio Grande do Norte) y Fortaleza (Ceará) (WHO, 2002). Y que posteriormente se extendieron al sur a los estados de Mato Grosso do Sul, o Sao Paulo (Brasil Ministério da Saúde, 2006). Desde 1998 a 2010, se han registrado un total de 32.459 casos de LV en 21 estados (Alvar y col., 2012). Doblándose la incidencia de 1.500 casos de media al año en los 80, a más de 3.000 desde 2000 (Brasil Ministério da Saúde, 2006). Actualmente, se registran en torno a 3.000 casos de LV por año, con una incidencia de aproximadamente 1,85 casos por 100.000 habitantes (Maia-Elkhoury y col., 2008), junto con una seroprevalencia de casos caninos por encima del 20% en muchos estados (Dantas-Torres y Brandão-Filho, 2006).

La emergencia de la coinfección *Leishmania*/VIH está asociada al solapamiento de la distribución geográfica de ambos patógenos, al que contribuyen la urbanización de la leishmaniosis y la ruralización del SIDA (WHO 2002; Rangel y Vilela, 2008), este fenómeno ha tenido en Brasil menos impacto del esperado, probablemente debido a la amplia cobertura de tratamiento antirretroviral por parte del gobierno Brasileño (Rabello y col., 2003). Si bien el registro de casos de coinfección muestra una tendencia ascendente desde 25 casos registrados en 2001 a 78 en 2004, representando el 2.3% de los casos de LV registrados ese último año. (OPS/OMS, 2006).

Entre 1981 y 2010, han sido notificados 141 casos en México, de ellos el 90% pertenece al estado de Chiapas (Baez-Villaseñor, 1952; OPS/OMS, 2006; Pastor-

Santiago y col., 2012). Además, se ha registrado una seroprevalencia en perros del 19% en este mismo estado (Pastor-Santiago y col., 2012), y del 11,9% en Mérida (Arjona-Jimenez y col., 2012).

En América Central, *L. infantum* causa principalmente sintomatología cutánea, aunque se han diagnosticado algunos casos de LV (Zeledón y col., 1982; Oliveira-Neto y col., 1986; Carrillo y col., 1999; Zeledon, 1991; Ponce y col., 1991; Noyes y col., 1997; Belli y col., 1999; Campos-Ponce y col., 2005; de Lima y col., 2009). En Guatemala, el primer caso de LV reportado data de 1949, y desde 2000 a 2007 han sido reportados 67 casos, con una incidencia a fecha del 2008 de 9,8 casos/100,000 habitantes (Alvar y col., 2012). En Honduras han sido notificados 300 casos desde 1974. El foco más importante se encuentra en el sur del país en la costa del pacífico, afectando a los departamentos de Choluteca, Valle y El Paraíso. En la isla de El Tigre, cerca de la costa del Pacífico se ha encontrado una seropositividad en perros por encima del 15,6%. Aquí *L. infantum* causa principalmente LC atípica, sin embargo, la incidencia de LV es de 0,03 casos por 100.000 habitantes (Ponce y col., 1991; Alvar y col., 2012). En Nicaragua, el primer caso de LV del que se tiene constancia data de 1994 (Duarte y col., 1994) y son pocos los casos nuevos de LV notificados, concentrándose en su mayoría en la región del pacífico. Por el contrario, es común encontrar LC atípica causada por *L. infantum* (Darce y col., 1991; Belli y col., 1999; Alvar y col., 2012).

Colombia es uno de los tres países con mayor número de especies de *Leishmania* (siete en total) que afectan al ser humano (Corredor y col., 1989). Existen dos focos de LV claramente diferenciables; uno en la costa norte con *Lu. evansi* como vector dónde se concentran el 88% de los casos, y el resto de casos acontecen en el valle del río Magdalena dónde *Lu. longipalpis* es el vector (Velez y col., 1995; Cortés y Fernández, 2008). El mayor número de casos se presentan en los departamentos de Córdoba, Sucre, Bolívar, Tolima y Huila (Corredor y col., 1989; Travi y col., 2001), con seropositividades en perros desde 5,1% al 31,5% dependiendo de la zona (Fernández y col., 2006; Romero y col., 2009).

En Venezuela se han detectado pequeños focos rurales de baja endemicidad en casi todos los estados, aunque las mayores prevalencias se encuentran en los estados de Anzoátegui, Sucre, Monagas, Aragua, Lara o en Nueva Esparta (Isla Margarita) dónde se han detectado el 26% de los casos totales del país, y un 20% de perros seropositivos (Convit y col., 1993; Zulueta y col., 1999; Zerpa y col., 2001; Feliciangeli y col., 2005; 2006). Desde 1990 a 2007, han sido notificados 31 casos con una incidencia global de 0,2 por 100.000 habitantes. Sin embargo, en Anzoátegui la incidencia es mucho más elevada (6 casos por 100.000 habitantes) (Zerpa, 2000).

En Bolivia se han descrito tanto perros como vectores (*Lu. Longipalpis*) infectados. Los casos de LV son raros (García y col., 2009), 10 casos humanos en 2004 en Taypiplaya y 2 en 2010 en Puerto Suárez (Desjeux y col., 1983; Dimier-David 1991), y un caso de coinfección *Leishmania*-VIH en 2009 (Torrico y col., 2009).

En Paraguay se han diagnosticado 53 casos desde 2000 a 2005, pero con una letalidad del 17%. El primer caso notificado data de 1913 aunque posiblemente fue importado (Migone, 1913), y ya en 1945 se confirmó el primer caso autóctono (Boggino y Maas, 1945). El 90% de los casos proceden del Departamento Central y Capital (Asunción), donde los casos humanos desde 1997 a 2004 ascienden a 23, con un rango de seroprevalencia en perros del 3.1 y del 11.8% en esta misma zona (Canese, 2000; OPS/OMS, 2006, Alvar y col., 2012).

El determinante más importante en la emergencia de la LVZ son probablemente los cambios ecológicos, demográficos y socioeconómicos que han acompañado al proceso de urbanización, y que han tenido un importante impacto en la salud y el bienestar de los desplazados (Utzinger y Keiser, 2006) (ver figura 1.16).

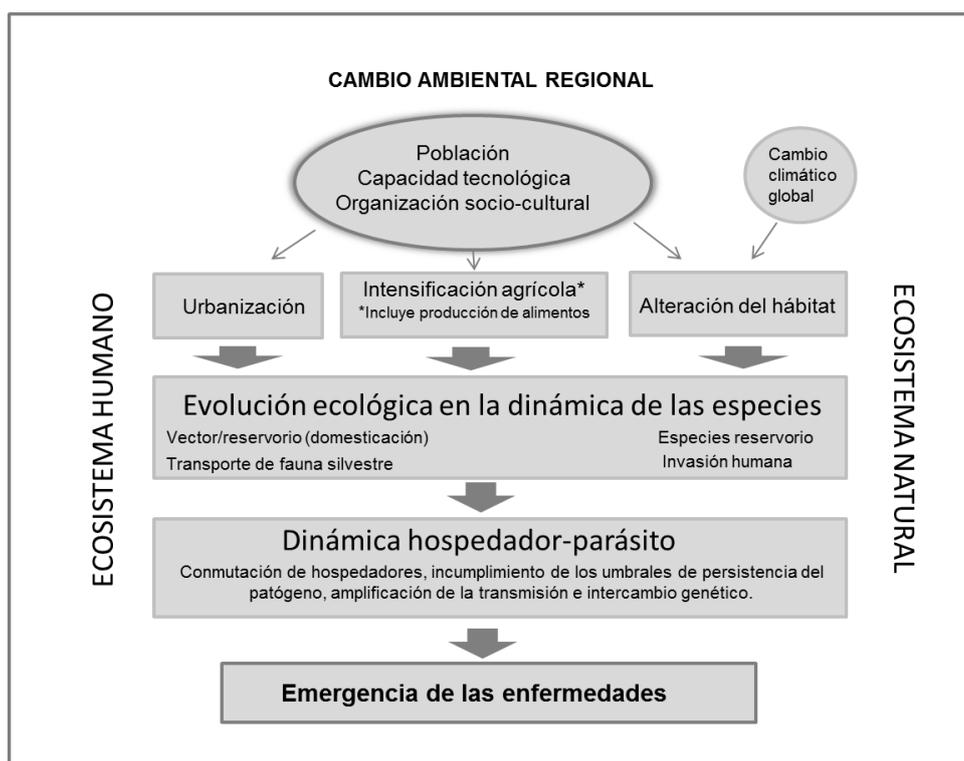


Figura 1.16. Relación causal de los cambios a nivel regional y la emergencia de enfermedades representada como un binomio "Ecosistema Humano-Natural" (Modificada de Wilcox y Gubler, 2005).

Uno de los aspectos socioeconómicos más relevantes en la emergencia y urbanización de la LV, lo constituyen los flujos migratorios constantes de la población

desde zonas pobres a las ciudades en busca de mejorar sus condiciones de vida (Rangel y Vilela, 2008). En los últimos 20 años ha habido una migración importante de personas desde las zonas rurales a zonas urbanas. En la figura 1.17 se puede observar el incremento en los últimos años de la población viviendo en zonas urbanas y en la figura 1.18, un ejemplo del incremento de casos de LV en zonas urbanas respecto a los rurales en Brasil. El rápido crecimiento de las ciudades con áreas densamente pobladas, provoca la introducción de personas no inmunes en áreas con ciclos endémicos o enzoóticos de transmisión (WHO., 2010), o viceversa, junto con la ocupación desorganizada de suburbios donde las condiciones sanitarias son escasas, la malnutrición es común y los perros son numerosos. Estos emigrantes llevan consigo sus pertenencias y animales con los que mantienen un estrecho contacto, ya que los alojan tanto dentro como en los alrededores de sus casas. En este contexto es destacable la malnutrición como un importante factor de riesgo para la adquisición de la enfermedad en humanos (WHO, 2002; Werneck, 2008).

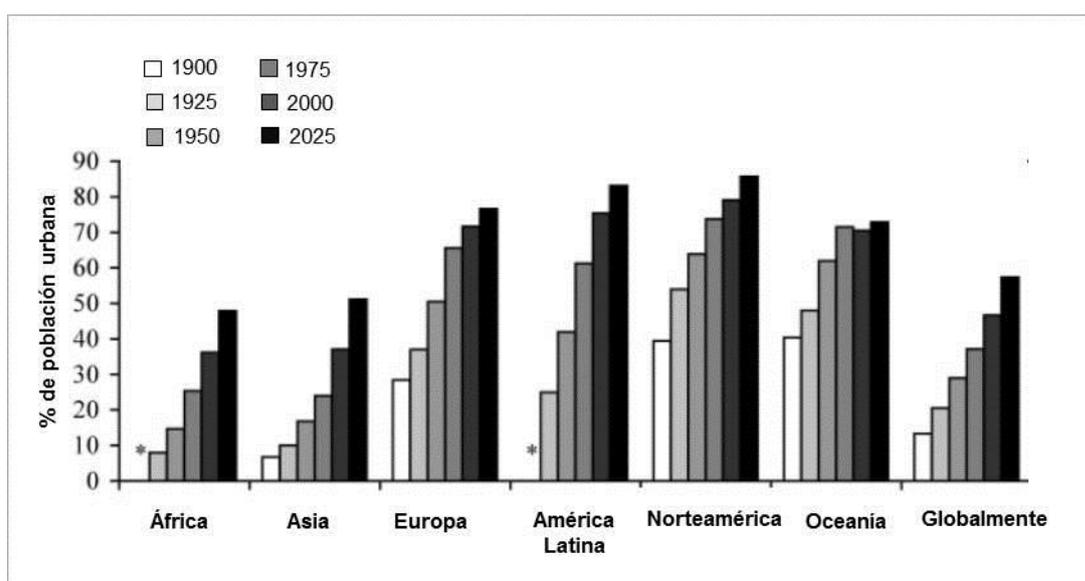


Figura 1.17. Porcentaje de personas viviendo en zonas urbanas en seis subregiones, y globalmente, desde 1900 a 2000. *No existen datos de la población en África y América Latina en 1900 (Modificada de Utzinger y Keiser, 2006).

Es de suponer que uno de los aspectos determinantes en la urbanización de la leishmaniosis en América Latina sea el comportamiento del vector, especialmente por la flexibilidad tanto en sus hábitos alimenticios como de adaptación al medio (Costa, 2008).

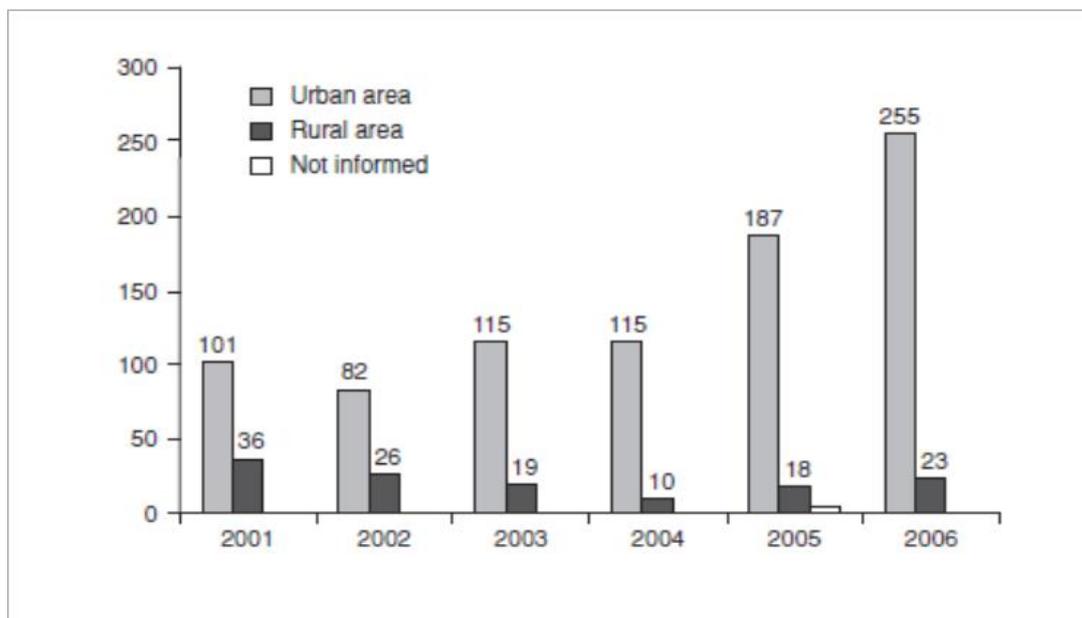


Figura 1.18. Distribución por área de los casos confirmados de LV en Fortaleza y Ceará (Brasil), desde enero de 2001 a diciembre de 2006 (Albuquerque y col., 2009).

La alteración del ambiente ha llevado a la destrucción masiva del bosque primario y a la creación de nuevos ambientes modificados por el hombre. El desarrollo concomitante de tierras de cultivo y nuevos asentamientos urbanos ha sido un condicionante propicio para el nuevo asentamiento y expansión del vector *Lu. Longipalpis*, favoreciendo el establecimiento de nuevos ciclos de transmisión (WHO, 2002; Dantas-Torres, 2007). Todo esto ha facilitado el contacto directo entre el vector y sus reservorios animales con los humanos, propiciando que la densidad de *Lu. longipalpis* en casas y refugios de animales pueda alcanzar niveles muy altos (Tesh, 1995).

Otro factor que puede haber contribuido a la emergencia de LVZ es la eliminación o discontinuidad de las campañas de rociamiento anti-anofelinos, que ha incrementado el número de vectores en el ámbito peridoméstico (Oliveira y col., 2006).

1.5. LEISHMANIOSIS CANINA

La infección por *L. infantum* en perros fue descrita por primera vez en Túnez por Nicolle y Comte en 1908 (Nicolle y Comte, 1908). La leishmaniosis canina (LCan) acontece en 50 de los 88 países donde la leishmaniosis humana está presente y afecta fundamentalmente a tres zonas geográficas: Brasil, China y la cuenca mediterránea. La LCan causada por *L. infantum* es considerada mundialmente la zoonosis más importante (Solano-Gallego, 2009). Los perros son el principal animal de compañía y por lo tanto, en el entorno doméstico y peridoméstico, juegan un papel fundamental como reservorios de la enfermedad en presencia de los flebotomos

vectores (Gramiccia y Gradoni, 2005; Diniz y col., 2008). Se estima que el número de perros infectados asciende a millones. Este alto porcentaje de perros infectados en zonas endémicas representa no sólo un problema veterinario sino también de salud pública, ya que la elevada prevalencia de LCan en un área es asociada con la transmisión de la infección a humanos (Costa, 2008).

En el perro la leishmaniosis por *L. infantum* presenta tanto manifestaciones viscerales como cutáneas. El perro también puede infectarse de manera ocasional por otras especies de *Leishmania* que pueden causar LV, LC y LMC en humanos (*L. donovani*, *L. tropica*, *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. panamensis*) (Dereure y col., 1991; Llanos-Cuentas y col., 1999; Reithinger y Davies, 1999; Madeira y col., 2006; Hassan y col., 2009; Solano-Gallego y col., 2009), aunque parece ser que el hecho de que el perro esté infectado por estas especies tiene escasa relevancia epidemiológica en la transmisión al ser humano (Lemrani y col., 2002; Dantas-Torres, 2007). Las especies de *Leishmania* que pueden infectar a los perros y su distribución geográfica se muestran en la tabla 1.3.

Especies de <i>Leishmania</i>	Distribución geográfica	Vectores probados	Vectores sospechosos
<i>L. infantum</i>	Cuenca Mediterránea	<i>Phlebotomus perniciosus</i> , <i>P. ariasi</i>	<i>P. longicuspis</i> , <i>P. syriacus</i> , etc.
	Oriente Medio	<i>P. perfiliewi</i> , <i>P. neglectus</i> <i>P. langeroni</i> , <i>P. tobbi</i>	
	Sudeste Asiático, Irán, Armenia, Afganistan	<i>P. kandelakii</i>	<i>P. brevis</i> , <i>P. halepensis</i> , etc.
	Asia Central, China	<i>P. chinensis</i> , <i>P. alexandri</i>	<i>P. smirmovi</i> , <i>P. transcausicus</i> , <i>P. longiductus</i>
<i>L. infantum/L. chagasi</i>	Centro y sudamérica	<i>Lutzomyia longipalpis</i> , <i>Lu. Evansi</i> <i>Lu. olmeca olmeca</i>	<i>Lu. antunesi</i> , <i>Lu. shannoni</i>
<i>L. donovani</i>	Este de África	<i>P. orientalis</i> , <i>P. martini</i>	<i>P. rodhaini</i>
<i>L. tropica</i>	Norte de África	<i>P. sergenti</i> , <i>P. arabicus</i>	<i>P. chabaudi</i> , <i>P. saevus</i>
<i>L. braziliensis</i>	Centro y sudamérica	<i>Lu. wellcomei</i> , <i>Lu. Spinicrassa</i> <i>Lu. whitmani</i> , <i>Lu. yucumensis</i> , <i>Lu. carrerai carrerai</i> , <i>Lu. llanosmartinsi</i> <i>Lu. ovallesi</i> , <i>Lu. intermedia</i> , <i>Lu. gomezi</i> <i>Lu. trapidoi</i> , <i>Lu. ylephiletor</i> , <i>Lu. umbratilis</i>	<i>Lu. Amazonensis</i> , <i>Lu. migonei</i> , <i>Lu. Panamensis</i> , <i>Lu. Paraensis</i> , <i>Lu. complexus</i> , <i>Lu. pessoai</i> , etc.
<i>L. peruviana</i>	Andes peruanos	<i>Lu. peruensis</i> , <i>Lu. verrucarum</i> , <i>Lu. Ayacuchoensis</i>	<i>Lu. noguchii</i> , <i>Lu. pescei</i>
<i>L. panamensis</i>	América central	<i>Lu. trapidoi</i> , <i>Lu. ylephiletor</i> , <i>Lu. gomezi</i> <i>Lu. panamensis</i> , <i>Lu. hartmanni</i>	<i>Lu. shannoni</i> , <i>Lu. ovallesi</i> , etc.

Tabla 1.3. Distribución geográfica de las especies de *Leishmania* que infectan a perros y sus flebotomos vectores (Adaptado de Solano-Gallego, 2009).

En cuanto al riesgo de adquirir la infección, se ha observado que los machos pueden tener mayor riesgo de ser infectados que las hembras (Brandonisio y col., 1992; Fisa y col., 1999; Zaffaroni y col., 1999; Zivicnjak y col., 2005). Aunque en algunos estudios epidemiológicos no se ha encontrado asociación con el género del perro (Abranches y col., 1991; Miró y col., 2007a).

Los perros son susceptibles de ser infectados a cualquier edad, pero la prevalencia de la infección parece presentar una distribución bimodal, con un pico en perros menores de 3 años y otro en perros de 8 a 10 años de edad (Alvar y col., 2004).

Por otro lado, no existe unificación respecto a la susceptibilidad a la infección y las razas de perros afectadas. En Francia, Portugal y Grecia, se ha observado que el Pastor Alemán (Ranque y col., 1997; Abranches y col., 1991), el Bóxer (Ranque y col., 1997), y el Doberman (Sideris y col., 1996) son las razas más susceptibles. Por el contrario en Brasil, se ha observado que los Cocker Spaniel de pelo largo, y los Bóxer son las razas más afectadas (França-Silva y col., 2003). Mientras que en Italia no se ha observado mayor susceptibilidad en ninguna raza (Pozio y col., 1981). En contraste se encuentra bien aceptada la resistencia de los Podencos Ibicencos en España (Solano-Gallego y col., 2000). Acorde con estas observaciones, parece muy probable que la resistencia o la susceptibilidad de los perros a la enfermedad pueda tener además una base genética (Palatnik-de-Sousa y Day, 2011). Se postula que el gen *Slc11a1* (solute carrier family 11 member a1) también denominado *N-ramp 1* (Altet y col., 2002, Sanchez-Robert y col., 2005), y algunos genes del complejo mayor de histocompatibilidad (Quinnell y col., 2003; Sanchez-Robert y col., 2008) pueden estar asociados a una mayor susceptibilidad a la leishmaniosis.

1.5.1. PATOGÉNESIS Y RESPUESTA INMUNE

El curso de la infección por *Leishmania* en perros está ligado tanto a la respuesta inmune del hospedador como a la persistencia y multiplicación del parásito (Reis y col., 2010). Después de la infección, pueden desarrollarse dos tipos de respuesta inmune mediada por los linfocitos T, una respuesta celular (Th1) asociada a la inmunidad protectora y otra respuesta humoral (Th2) asociada a la susceptibilidad o progresión de la enfermedad (Alvar y col., 2004; Baneth, 2008). Los diferentes componentes de la respuesta inmune y las interacciones entre ambos tipos de respuesta son realmente diversos y complejos. No observándose necesariamente uno u otro extremo de estas respuestas, sino más bien un espectro del balance entre las mismas, (Cabral y col., 1998; Reis y col., 2006a; 2006b; Baneth, 2008) (figura 1.19).

El primer elemento necesario para el establecimiento de la infección es la diseminación orgánica del parásito. Después de la picadura del flebotomo, los parásitos son distribuidos vía linfática o hematógena a los nódulos linfáticos, bazo, médula ósea y de ahí a otros órganos (Molyneux y Ashford, 1983).

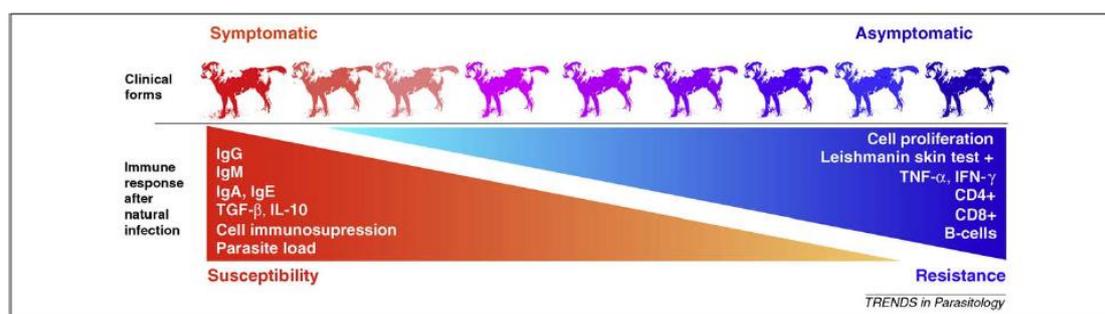


Figura 1.19. Espectro clínico en perros según la respuesta inmunológica presentada (Reis y col., 2010).

La resistencia en LCan va a estar asociada a bajos niveles de anticuerpos y a la existencia de respuesta inmune celular (Th1), con la producción de citoquinas por parte de células T activadas (CD4+), como; interferón γ (IFN- γ), interleukina-2 (IL-2) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Pinelli y col., 1994), que estimulan la actividad leishmanicida de los macrófagos (Vouldoukis y col., 1996). Siendo el óxido nítrico producido por estos macrófagos activados el principal efector capaz de inducir la muerte de los amastigotes de *Leishmania* (Santos-Gomes y col., 2002; Holzmuller y col., 2006). La evaluación de parámetros como proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) después de la estimulación antigénica, expresión de IFN- γ , TNF- α , CD4+, CD8+, células B o test de leishmanina positivo pueden ser usados como marcadores de resistencia (Reis y col., 2010).

La susceptibilidad a la enfermedad va a estar determinada por una marcada respuesta humoral (Th2) y una reducción o depresión en la producción de la inmunidad mediada por células (Barbieri, 2006). La depresión de la función de células T (CD4+) es manifiesta (Sacks y col., 1987; Carvalho y col., 1989). La respuesta Th2 induce la aparición de interleukina 4 (IL-4) y 10 (IL-10) que promueven la estimulación de los linfocitos B (Guarga y col., 2000; Noben-Trauth y col., 2003), generando elevadas concentraciones de γ -globulinas, tanto específicas como inespecíficas (Persechino y Oliva, 1986). IL-10 es considerada el regulador de la respuesta Th1, manteniendo el balance entre las respuestas Th1 y Th2. Un incremento en la expresión de parámetros como IL-10 y TGF- β (Factor de crecimiento transformante-beta), como inmunodepresores de la respuesta celular, o de anticuerpos presentes en suero como IgG, IgM, IgA e IgE, están relacionados con la progresión de la enfermedad clínica (Reis y col., 2010).

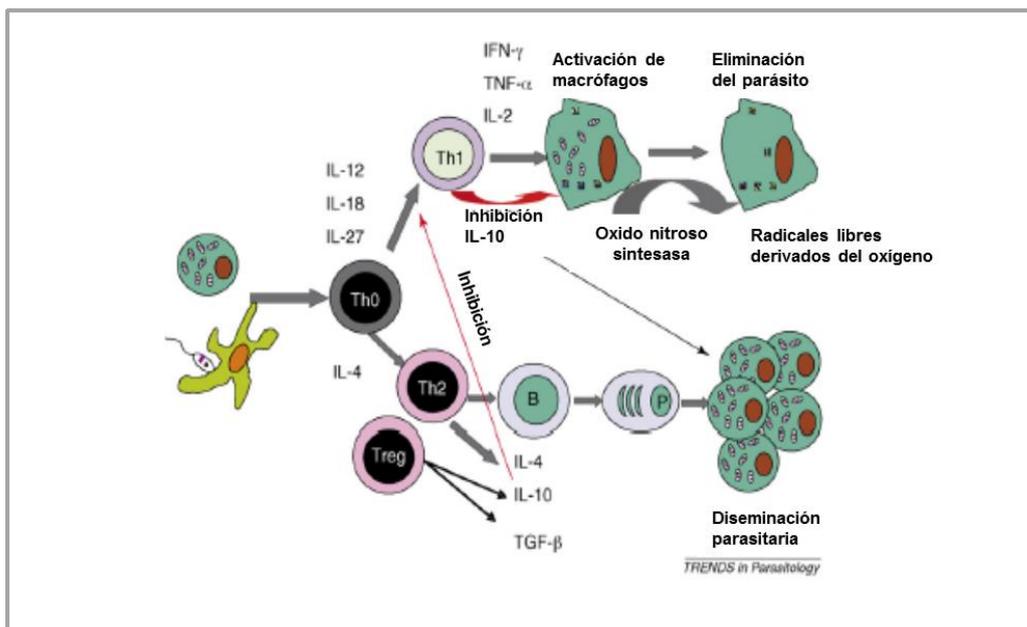


Figura 1.20. Respuesta inmune ante *Leishmania* (Adaptado de Baneth, 2008).

Los diferentes balances entre todos los factores implicados van a condicionar el espectro de las formas clínicas en la LCan en perros naturalmente infectados en cuyos polos se encuentran por un lado los perros con sintomatología severa con infección generalizada y por el otro perros completamente asintomáticos o con sintomatología leve (Barbieri y col., 2006; Reis y col., 2010). El cuadro clínico en el perro puede ser válido para orientar el diagnóstico de la LCan. El periodo de incubación puede oscilar entre varios meses e incluso más de un año (Rioux y col., 1979; Lanotte y col., 1979; Gaeta y col., 1994).

Los signos clínicos más comúnmente observados son linfadenopatía local o generalizada y alteraciones cutáneas. Los signos cutáneos incluyen dermatitis localizadas producidas por el vector en el punto de inoculación o generalizadas, coincidiendo con la diseminación del parásito (dermatitis queratoseborreica, ulcerativa, nodular o papulo-pustulosa) (Hervás y col., 1996; Fondevila y col., 1997; Solano-Gallego y col., 2004; Ordeix y col., 2005; Giunchetti y col., 2006). Se pueden observar lesiones cutáneas en más del 80% de los perros (Baneth y col., 2008), así como hiperqueratosis nasales y/o plantares, depigmentación nasal, inflamación periungueal, onicogriposis y eritema multiforme (Font y col., 1996; Blavier y col., 2001). También es posible encontrar piodermas bacterianos secundarios a algunas lesiones cutáneas.

Las linfadenopatías localizadas o generalizadas se caracterizan por un aumento en el tamaño de los nódulos linfáticos. Se detectan altas cargas parasitarias en los mismos y se ha observado elevada expresión de IL-10 y TGF-β en los nódulos linfáticos preescapulares (Alves y col., 2009). Sin embargo, aunque sean uno de los

signos que se presentan con mayor frecuencia (Slappendel, 1988), no aportan información específica sobre la gravedad de la enfermedad (Lima y col., 2004; Mylonakis y col., 2005).

A medida que la enfermedad avanza comienza la aparición de manifestaciones viscerales. Las reacciones inflamatorias proliferativas son las causantes de infiltración celular, que se hace extensiva provocando alteración estructural y funcional progresiva de los órganos afectados (Bourdeau y Groulade, 1988; dos-Santos y col., 2004). La continua estimulación antigénica y el exceso en la producción de anticuerpos son la causa de que se origine una hipergammaglobulinemia crónica, que da lugar a la formación y depósito de inmunocomplejos. Estos inmunocomplejos alteran el sistema de coagulación y el flujo sanguíneo al depositarse en localizaciones orgánicas tales como vasos sanguíneos (coagulaciones intravasculares, vasculitis) (Pumarola y col., 1991; Font y col., 1994), bazo, hígado, ojos (García-Alonso y col., 1996a) o riñones (glomerulonefritis membranosa) (Poli y col., 1991; Nieto y col., 1992; Zatelli y col., 2003). Por otro lado, también se favorece la diseminación del parásito ya que durante la opsonización del amastigote los anticuerpos facilitan su fagocitosis por parte del macrófago (Slappendel, 1988; Goto y Prianti, 2009). Los amastigotes libres provocan lesiones vasculares en pequeñas arterias en numerosos órganos como: piel, tracto intestinal, riñones, ojos y pulmones (Pumarola y col., 1991). Los amastigotes y los depósitos de IgG en los miocitos, provocan necrosis y atrofia en el tejido muscular (Vamvakidis y col., 2000). La formación de autoanticuerpos es la responsable de la destrucción de los eritrocitos que provoca una anemia no regenerativa que está presente en alrededor de un 40% de los enfermos crónicos (Ciaramella y col., 1997; Koutinas y col., 2001). La liberación de citoquinas por parte de los macrófagos es la causa de los trastornos generales de la enfermedad como fiebre, adelgazamiento, astenia y atrofia muscular (Ciaramella y col., 1997; dos-Santos y col., 2008).

El bazo de animales infectados por *L. infantum*, se caracteriza por un infiltrado celular mononuclear en la pulpa roja y la sustitución de linfocitos por macrófagos en la pulpa blanca (Alexandre-Pires y col., 2006). La hipertrofia del bazo es un signo poco frecuente (< 20%) (Almeida y col., 2005). En el hígado, la presencia de infiltrados inflamatorios provoca la formación de granulomas, hiperplasia e hipertrofia de las células de Kupffer. La parasitación de los hepatocitos provoca alteraciones morfológicas que afectan a la funcionalidad del hígado (Vianna y col., 2002). Existe una predominante acumulación de IL-10 en estos animales asociada a una elevada carga parasitaria (Lage y col., 2007). Los animales afectados pueden presentar vómitos, pérdida de peso, poliuria, polidipsia, ascitis e incremento de enzimas hepáticas. Giunchetti y col. (2008) destacan la asociación existente entre las

alteraciones hepáticas y la progresión de la enfermedad. En los riñones, el depósito de inmunocomplejos circulantes causa daño tanto glomerular como tubular. Si el número de inmunocomplejos es muy elevado provoca una glomerulonefritis aguda o extramembranosa que acaba causando fallo renal (López y col., 1996; Benderitter y col., 1988). Las lesiones articulares y óseas, como consecuencia del depósito de inmunocomplejos en las cavidades articulares pueden manifestarse en forma de cojeras y se consideran erosivas en los estados crónicos de la enfermedad (Wolschrijn y col., 1996).

Los problemas oculares son consecuencia de infiltrados de células plasmáticas y macrófagos parasitados que causan lesiones en distintas estructuras oculares y que afectan a ambos segmentos del ojo provocando; blefaritis, conjuntivitis o queratitis (Pena y col., 2000; Naranjo y col., 2005; Pena y col., 2008) y en menor frecuencia hemorragias retinianas, iridociclitis, coriorretinitis, uveitis o desprendimiento de retina (García-Alonso y col., 1996b). Las hemorragias en mucosa nasal (epistaxis), en mucosa vesical (hematuria) o en mucosa intestinal (melena), pueden estar asociadas a ulceraciones tisulares, lesiones inflamatorias o a un defecto de la funcionalidad plaquetaria (Jüttner y col., 2001; Ciaramella y col., 2005; Petanides y col., 2008). Se han descrito vasculitis inmunomediadas por depósitos de inmunocomplejos que contribuyen a estos procesos hemorrágicos (Pumarola y col., 1991).

1.5.2. ALTERACIONES CLÍNICO- PATOLÓGICAS

Los resultados de la analítica pueden orientar el diagnóstico, sobre todo en los casos dudosos, y contribuyen a conocer el estado general del animal. Además, suponen un apoyo importante en el seguimiento de los perros tras el tratamiento. El hemograma suele caracterizarse por la presencia de anemia, leucopenia en las formas graves y trombocitopenia, por afección del sistema hematopoyético. En el perfil bioquímico hepato-renal, observamos en algunos casos valores elevados de enzimas hepáticas y, en animales con lesiones renales, una elevación de la creatinina y urea por la deposición de inmunocomplejos a nivel del glomérulo renal (Rallis y col., 2005). En el proteinograma destaca la hipergammaglobulinemia y la inversión del cociente albúmina/globulinas, estando la hipoalbuminemia asociada a un incremento de las globulinas (Martínez-Subiela y col., 2002). Puede observarse un incremento del cociente proteínas/creatinina en orina y la presencia de ciertas enzimas hepáticas en la misma (Palacio y col., 1995).

1.5.3. DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSIS CANINA

La LCan es una enfermedad que puede presentar gran variedad de signos clínicos, con ausencia de manifestaciones patognomónicas, que hacen que la infección por *Leishmania* comparta muchas características clínicas y patológicas con otras enfermedades caninas (Ferrer, 1999). El diagnóstico diferencial deberá establecerse siempre que los animales enfermos presenten signos clínicos compatibles con la LCan (Miró y Molina, 2007). Por otro lado, la baja sensibilidad en la detección del parásito por los métodos diagnósticos convencionales y las diferentes respuestas inmunitarias que presentan los perros infectados por *L. infantum* (Barrouin-Melo y col., 2004; Gomes y col., 2008; Mateo, 2007), hacen necesario un diagnóstico basado en un enfoque integrado, teniendo en cuenta anamnesis, signos clínicos, resultados hematológicos, bioquímicos y urinarios, evidenciar la presencia del parásito o evaluar la respuesta inmune (Paltrinieri y col., 2010). Llegar al diagnóstico preciso de LCan puede ser complejo, el diagnóstico de LCan debe ser fiable, tanto en los pacientes enfermos como en aquellos infectados de manera subclínica (Alvar y col., 2004).

En áreas endémicas la leishmaniosis clínica representa solamente la punta del “iceberg”, pero la realidad es que la mayoría de la población que está expuesta al parásito puede llegar a infectarse sin manifestar la enfermedad de forma evidente (Leontides y col., 2002; Baneth y col., 2008) (ver figura 1.21).

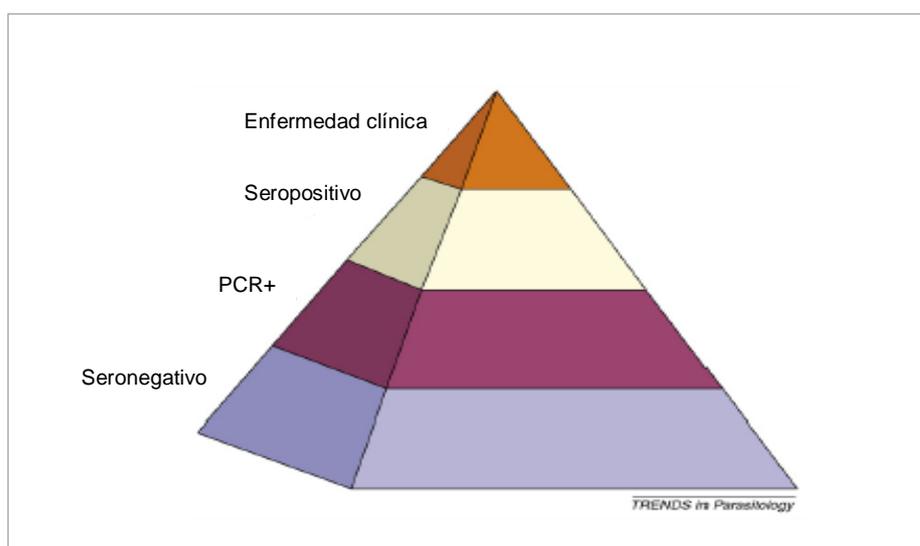


Figura 1.21. Representación esquemática de la distribución de leishmaniosis en la población canina en un foco endémico (modificada de Baneth y col., 2008).

De hecho, no se debe olvidar que los perros asintomáticos también son infectivos para los vectores, aunque en menor medida que los sintomáticos (Campino, 2000). Por lo tanto, la detección temprana de los animales infectados, particularmente antes de la aparición de los primeros síntomas e incluso antes de la seroconversión, es un punto crítico para evitar la dispersión de la infección, como sería el caso del control de la leishmaniosis humana (Maia y Campino, 2008). La infección subclínica no es necesariamente permanente y factores como la inmunosupresión u otras enfermedades concomitantes pueden romper el equilibrio y orientarlo hacia la aparición de signos clínicos (Solano-Gallego y col., 2011), como se observa en humanos en la coinfección *Leishmania*-VIH (Alvar y col., 2008).

1.5.3.1. ANAMNESIS

Para realizar una anamnesis exhaustiva se debe tener en cuenta la edad, sexo y raza del perro. Así como otros datos epidemiológicos relevantes como el hábitat, tipo de actividad que realizan, si el perro vive o ha viajado a zona endémica y ha estado expuesto a la picadura de los flebotomos. Y si en tal caso el perro ha recibido tratamientos preventivos contra los flebotomos o que puedan interferir en la eficiencia del sistema inmune (Paltrinieri y col., 2010).

1.5.3.2. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico del laboratorio puede llevarse a cabo usando diferentes métodos: parasitológicos, con observación directa del parásito, detección de ADN, o indirectos mediante el uso de técnicas inmunológicas. Dependiendo de las razones que pueden llevar a la realización de pruebas en laboratorio (estudios epidemiológicos, investigación, confirmación rutinaria de la infección por *Leishmania*, o control terapéutico) existen diferentes pruebas disponibles. Todas ellas van a tener unos márgenes de sensibilidad y especificidad, reacciones cruzadas con otros agentes infecciosos, así como una distinta relación coste/complejidad en la realización, la elección de una u otra prueba (o combinación de ellas) va a depender del objetivo planteado (Schallig y col., 2004; Baneth y Aroch, 2008; Gomes y col., 2008).

1.5.3.2.1. MÉTODOS DIRECTOS

Son los más fiables ya que consisten en evidenciar el parásito por visualización directa (observación microscópica de frotis o cultivo) o mediante técnicas de biología molecular como la PCR. Es un método que goza de una alta especificidad, en cambio la sensibilidad está condicionada por factores como el tipo de muestra biológica

elegida o la fase en la que se presente la enfermedad, que va asociada a la carga parasitaria (Saridomichelakis y col., 2005; Mateo, 2007; Manna y col., 2009).

1.5.3.2.1.1. EXAMINACIÓN MICROSCÓPICA

Se puede llegar a un diagnóstico de certeza, con la observación microscópica de los amastigotes de *Leishmania* en distintas muestras biológicas; frotis teñidos mediante métodos metacromáticos convencionales (Giemsa, May-Grunwald, Diff-Quick) de órganos o tejidos infectados normalmente: a partir de biopsias o aspirados de órganos hematopoyéticos (médula ósea, nódulo linfático, fluido sinovial, hígado o bazo), así como de piel y sangre (Alvar y col., 2004; Saridomichelakis y col., 2005). Las muestras son obtenidas por procedimientos más o menos invasivos, y no siempre se llega a la observación del parásito (sobre todo en perros asintomáticos), debido a la baja sensibilidad de la técnica (Ferrer, 1999; Alvar y col., 2004). Sin embargo hay que tener en cuenta que el hallazgo de *Leishmania* en médula ósea o nódulo linfático, no siempre va a indicar que los signos clínicos observados van a estar provocados por éste parásito. Pero encontrar el parásito en los tejidos que presenten lesiones compatibles con leishmaniosis, sí que es evidencia de que el parásito es el que causa las lesiones (Paltrinieri y col., 2010).

1.5.3.2.1.2. CULTIVO

El cultivo "*in vitro*" de diferentes tejidos puede mejorar la sensibilidad de la detección parasitaria mediante microscopía. Aunque no todas las especies y cepas de *Leishmania* tienen la misma tasa de crecimiento, ni todos los tejidos y órganos, aun siendo del mismo perro, poseen la misma carga parasitaria, realizando réplicas seriadas se puede incrementar la sensibilidad diagnóstica (Evans, 1989). Los medios de cultivo usados pueden ser: monofásicos como medio de *Drosophila* de Schneider, M199, RPMI, medio de Grace, o difásicos como Novy-McNeal-Nicolle (NNN) o infusión de cerebro y corazón. Siendo el más utilizado el NNN. Los materiales biológicos con mayor tasa de positivos son aspirado de bazo (AB), nódulo linfático (NL) y médula ósea (MO) (Madeira y col., 2006; Maia y col., 2009). Algunos autores postulan que el AB debe de ser el órgano de elección para cultivo (Barrouin-Melo y col., 2005; Rosypal y col., 2005b). Sin embargo, debido a que la toma de muestra en estos casos es muy invasiva, se puede usar aspirado de NL poplíteo y MO como muestra alternativa en el diagnóstico. Aunque es 100% específico, debido a inconvenientes como el retraso diagnóstico (en ocasiones puede superar las cuatro semanas) (Maia y col., 2009), y la posibilidad de contaminaciones, queda en un segundo plano en cuanto al diagnóstico.

Y se utiliza sobre todo en estudios epidemiológicos que requieren el aislamiento del parásito para su posterior tipificación (Alvar y col., 2004; Maia y Campino, 2008).

1.5.3.2.1.3. REACCIÓN EN CADENA POR LA POLIMERASA (PCR)

La técnica de PCR consiste en la amplificación de fracciones de ADN de *Leishmania* extraídas a partir de diferentes tipos de muestras biológicas. Es útil para determinar la presencia e identificación de parásitos en los casos activos, y también sirve para monitorear la cura parasitológica después de un tratamiento. Se considera una técnica de elevada especificidad y sensibilidad, sobre todo si el fragmento diana posee múltiples copias (como el gen que codifica el ARN de la subunidad pequeña del ribosoma o los minicírculos de ADN del kinetoplasto), y más aún si se utiliza una nested-PCR (PCR anidada) en lugar de una PCR convencional (Roura y col., 1999; Fisa y col., 2001; Muller y col., 2003, Cortés y col., 2004).

La sensibilidad y especificidad de la PCR es mayor en muestras de médula ósea, nódulo linfático, bazo o piel (Manna y col., 2004; Maia y col., 2009; Reis y col., 2009). Aunque se puede encontrar ADN de *Leishmania* en otras muchas muestras (Andrade y col., 2002; Reithinger y col., 2002; Barrouin-Melo y col., 2005; Diniz y col., 2005; Rosypal y col., 2005b; Franceschi y col., 2007). Usando sangre periférica, la toma de muestras es más simple y menos invasiva, lo que facilita el diagnóstico y la aceptación por parte de los dueños. Pero la duración, constancia e intensidad de la parasitemia en los perros es todavía desconocida, pudiendo acontecer falsos negativos especialmente en perros asintomáticos (Lachaud y col., 2002). Hay que destacar que un resultado PCR negativo en un perro clínicamente sospechoso, no es suficiente para descartar la infección (Baneth y Aroch, 2008).

1.5.3.2.1.4. PCR A TIEMPO REAL (RT-PCR)

La técnica de PCR a tiempo real (RT-PCR), permite la identificación y cuantificación precisa del ADN en el material de partida. Pudiendo tener la sensibilidad de una nested-PCR sin perder especificidad (Francino y col., 2006) y determinar la carga parasitaria de la muestra estudiada, de especial utilidad en el seguimiento durante el tratamiento (Pennisi y col., 2005; Manna y col., 2008a; Quaresma y col., 2009). Han sido desarrollados diferentes protocolos basados en el uso de sondas fluorescentes para monitorizar la amplificación de los productos de PCR (Rolão y col., 2004). Actualmente es una técnica muy útil para monitorizar la eficacia del tratamiento de la leishmaniosis y predecir posibles recidivas asociadas al acantonamiento de parásitos residuales en algunos tejidos durante el seguimiento (Pennisi y col., 2005; Francino y col., 2006; Manna y col., 2008a; Solano-Gallego y col., 2009).

1.5.3.2.2. MÉTODOS INDIRECTOS

Las técnicas mayoritariamente utilizadas en el diagnóstico de la LCan son la inmunofluorescencia indirecta (IFI), la técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA) y los test inmunocromatográficos o dipsticks (ICT) (Solano-Gallego y col., 2009). Existe una correlación positiva clara entre la titulación de anticuerpos anti-*Leishmania* y la presencia de signos clínicos de la enfermedad (Solano-Gallego y col., 2001; Reis y col., 2006; Teixeira Neto y col., 2010). Un elevado título de anticuerpos podría confirmar una LCan, sin embargo, un título bajo, no debe ser confirmativo de la infección por *Leishmania*, ya que la patología que presenta el perro podría ser debida a otra causa, sobre todo en perros asintomáticos o que presenten cuadros clínicos atípicos (Solano-Gallego y col., 2011). Es recomendable la realización de más de un test serológico para mejorar el diagnóstico (Campino, 2000). Un resultado claramente positivo por cualquiera de estas técnicas, junto a un cuadro clínico compatible, puede ser suficiente para establecer el diagnóstico definitivo, pero hay que ser cautos a la hora de interpretar un resultado dudoso, y tener en cuenta que en la naturaleza la seroconversión de los perros puede ocurrir de 1 a 22 meses (media: 5 meses) tras la infección (Moreno y Alvar, 2002).

Los ensayos serológicos tienen a su vez problemas intrínsecos como son la persistencia de anticuerpos específicos después de la recuperación o las reacciones cruzadas con otros patógenos como *Trypanosoma cruzi* y *Ehrlichia canis* (Ferreira y col., 2007). Por ello, se necesitan altos niveles de sensibilidad y especificidad en las técnicas para evitar los falsos negativos que pueden subestimar las tasas de infección en áreas endémicas, y los falsos positivos que pudieran llevar a eutanasia o tratamiento innecesario en perros no infectados.

En zonas endémicas, la respuesta humoral con inmunoglobulinas específicas en general es muy intensa pero puede subestimar las tasas de infección (Alvar y col., 2004), ya que la producción de anticuerpos es baja al principio, al final de la infección, o en infecciones asintomáticas. Los perros infectados generalmente van incrementando gradualmente el título de anticuerpos con el tiempo (Oliva y col., 2006).

1.5.3.2.2.1. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

La técnica de IFI es considerada el método de referencia del diagnóstico serológico por la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE) (Gradoni y Gramiccia, 2000). Este test, el cual usa como fuente antigénica una suspensión de promastigotes completos de *Leishmania*, es muy útil en estudios epidemiológicos, detección de casos clínicos, y seguimiento después del tratamiento (Fernández-Pérez y col., 1999;

Gradoni, 2002; Mancianti y col., 1996; Alvar y col., 2004). El título de corte establecido oscila entre 1:40 y 1:360, y varía según el laboratorio (Solano-Gallego y col., 2009). Sin embargo, su realización requiere de habilidad, experiencia y equipamiento específico (microscopio de fluorescencia). Se dispone de unos cuantos test comerciales para perros, aunque los antígenos obtenidos en laboratorio son normalmente más efectivos (Gradoni, 2002). La sensibilidad descrita abarca desde un 21,6% (Silva y col., 2001) a un 100% (Ciaramella y col., 1997). Se pueden dar reacciones cruzadas con *Trypanosoma cruzi* en áreas endémicas para ambas enfermedades (América Latina y sur de los Estados Unidos) (Camargo y Rebonato, 1969; Kjos y col., 2008).

1.5.3.2.2.2. TEST DE AGLUTINACIÓN DIRECTA (DAT)

Este método se basa en el uso de promastigotes teñidos, bien en suspensión o liofilizados. Puede ser llevado a cabo tanto en suero como en plasma. Es barato y simple de realizar, el uso del antígeno liofilizado hace que esta técnica sea adecuada para su uso tanto en el terreno (Neogy y col., 1992; Schallig y col., 2002a), como en el laboratorio (Meredith y col., 1995). En varios estudios llevados a cabo en perros de zonas endémicas de LV, el DAT ha mostrado una sensibilidad del 70,6% (Mohebbali y col., 2004) y del 100% (da Silva y col., 2006) y una especificidad del 84,9% (Mohebbali et al., 2004) y del 100% (Neogy y col., 1992; Schallig y col., 2002a). Este método posee algunas de las limitaciones como son el periodo de incubación (18 h) y que se deben realizar diluciones seriadas. Esto último hace tedioso el análisis de un gran número de muestras (el Harith y col., 1989); Gómez-Ochoa y col. (2003) han desarrollado un "Easy DAT", con algunas modificaciones al protocolo original que le confieren una reducción en el coste y disminución del tiempo de elaboración del antígeno. Existe también un test rápido de aglutinación para cribado (FAST, fast agglutination screening test) que combina una elevada concentración de parásitos con una reducción del volumen a testar. Requiere una sola dilución y los resultados se pueden obtener en 3 horas. Se han obtenido sensibilidades desde 93,6% a 97,7% y especificidades desde 89,0% a 93,0%, en sueros de perros con LCan (Schallig y col., 2002b;2004).

1.5.3.2.2.3. ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA)

La técnica de ELISA puede ser usada tanto en terreno como en laboratorio, ya que permite el análisis de gran número de muestras en poco tiempo, es fácil de realizar y se puede llevar a cabo con varios antígenos. Aunque existen algunos kits comerciales rápidos (dot-ELISA -membrana de nitrocelulosa- o Snap1 CLATK -se

puede realizar en sangre completa-) (Vercammen y col., 1998; Ferroglio y col., 2008), la mayoría de los protocolos en la mayoría de los laboratorios son desarrollados “in-house” (Paltrinieri y col., 2010). La seropositividad es objetiva ya que la reacción colorimétrica se lee con un espectrofotómetro. La sensibilidad y especificidad de la técnica de ELISA va a depender del antígeno de elección, que puede ser desde proteínas somáticas escasamente purificadas, hasta componentes estructurales, proteínas de membrana, péptidos sintéticos o proteínas recombinantes (Porrozi y col., 2007; Miró y col., 2008). Además se han desarrollado diferentes variantes del método clásico (ELISA competitivo, Dot-ELISA, FAST-ELISA) que son de gran utilidad en los estudios de campo por su simplicidad, rapidez de ejecución y sensibilidad, y muy útiles para estudios epidemiológicos en áreas endémicas de la LCan (Dietze y col., 1995; Cardoso y col., 2004; Mateo, 2007). Las sensibilidades abarcan desde 94.1 a 100% y especificidades hasta del 100% (Fisa y col., 1997; Mettler y col., 2005).

El uso de proteínas recombinantes permite aumentar la especificidad. Como es el caso del antígeno recombinante rK39, que ha sido evaluado como un buen marcador de LCan (Rhalem y col., 1999; Scalone y col., 2002; Mettler y col., 2005). Las distintas sensibilidades y especificidades para ELISA con diferentes antígenos recombinantes puede verse en la tabla 1.4. Aunque en vista de los resultados obtenidos, solo el antígeno rK39 y el antígeno quimérico múltiple rLiP2a–rLiP2b–rLiP0–rH2A se encuentran comercializados.

Antígeno	Referencia	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
rLdA2	Carvalho y col., 2002	87,0	100,0
Hsp70	Andrade y col., 1999	75,0	-
rLiP0	Soto y col., 1995a	78,0	-
rLiP2a, rLiP2b	Soto y col., 1995b	80,0	100,0
rHSp83	Angel y col., 1996	88,0	-
rHSp70 (FAST)	Quijada y col., 1996	100,0	100,0
rLiH3 (FAST)	Soto y col., 1996	81,00	100,00
LI gp63	Morales y col., 1997	100,0	-
LiP2a-rLip2b-rLiP0-rLiH4 (FAST)	Soto y col., 1998	79,0-93,0	96,0-100,0
Hsp70, KMP-11	Nieto y col., 1999	100,0	-
rLiH2A, rLiH2B, rLiH3,rLiH4 (FAST)	Soto y col., 1999	44,0-72,0	-
rPSA	Boceta y col., 2000	100,0	-
rK-9	Rosati y col., 2003	95,0	100,0
rK-26	Rosati y col., 2003; Rosário y col., 2005	99,1-100,0	96,0-100,0
rK-39	Rosário y col., 2005	95,0-98,1	100,0
rK-40	Mettler y col., 2005	52,9-64,7	96,0-100,0
rK-9-rK26-rK-39	Boarino y col., 2005	96,0	99,0

Tabla 1.4. Sensibilidad y especificidad de diferentes antígenos recombinantes usados en ELISA (Adaptado de Maia y Campino, 2008).

1.5.3.2.2.4. TEST INMUNOCROMATOGRÁFICO RÁPIDO (ICT)

Los test inmunocromatográficos rápidos (ICT) o “dipsticks” usados para la detección cualitativa de anticuerpos anti-*Leishmania*, están recientemente disponibles. Son muy atractivos ya que su formato es simple, son fáciles de usar y la respuesta es inmediata, pudiendo ser realizados por el mismo profesional veterinario, siendo ideales para su uso en el terreno (Gradoni, 2002; Reithinger y col., 2002; Mohebalí y col., 2004; Mettler y col., 2005; Otranto y col., 2005; Rosypal y col., 2005b, Lemos y col., 2008). Se dispone comercialmente de un ICT basado en una tira de nitrocelulosa con el antígeno rK39 (epítipo repetitivo basado en una kinesina de *Leishmania*) que se encuentra altamente conservada en las especies viscerotrópicas del *parásito*; *L. (L.) donovani*, y *L. (L.) infantum* (Burns y col., 1993).

El rK39-ICT ha mostrado ser muy sensible y específico tanto para el diagnóstico de LV humana (Sundar y col., 1998; Jelinek y col., 1999; Bern y col., 2000; Delgado y col., 2001; Zijlstra y col., 2001; Carvalho y col., 2003) como LV canina (da Costa y col., 2003; Mohebalí y col., 2004; Otranto y col., 2004; Toz y col., 2004; Mettler y col., 2005, Lemos y col., 2008). En varios estudios se ha descrito una pérdida de sensibilidad de este test al ser aplicado en perros, sobre todo en asintomáticos; registrando sensibilidades del 72 a 77% (Reitinger y col., 2002), 83% (Lemos y col., 2008), ó 96% (da Costa y col., 2003). Sin embargo, las reacciones cruzadas son menos frecuentes cuando se usan antígenos recombinantes como el rK39 (Boarino y col., 2005; Porrozzi y col., 2007). Aunque han sido descritos falsos positivos debidos a reacciones cruzadas con *Neospora caninum* y *Hepatozoon canis* (Mettler 2005), pero por el contrario, no se conocen reacciones cruzadas con *L. braziliensis* o *T. cruzi* (Qu y col., 1994; Burns y col., 1993; Badaró y col., 1996; Delgado y col., 2001; da Costa y col., 2003). El rK39-ICT puede ser útil para confirmar los casos clínicamente sospechosos debido a su elevada especificidad en perros sintomáticos (Mettler y col., 2005, Lemos y col., 2008).

1.6. CONTROL DE LA LVZ

La complejidad de la enfermedad y el hecho de que la LVZ sea una enfermedad de gran importancia en medicina humana y veterinaria, hacen que el control efectivo de la misma necesite de un enfoque multidisciplinar (Palatnik de Sousa y Day, 2011).

Las estrategias propuestas para el control se deben centrar a nivel de:

1. Vector:
 - i) Control vectorial
 - ii) Profilaxis
2. Hospedador vertebrado:
 - i) Diagnóstico precoz de los casos humanos.
 - ii) Control de reservorios domésticos.
 - iii) Inmunoterapia.
3. Parásito:
 - i) Quimioprofilaxis.
 - ii) Quimioterapia.

En América Latina, siguiendo las recomendaciones de la OPS/OMS, el control de la LVZ se centra en: a) el tratamiento de casos humanos, b) sacrificio de perros infectados, y c) tratamiento con insecticidas de las viviendas humanas y del reservorio canino (Tesh, 1995; Palatnik de Sousa y Day, 2001). Pero se reconoce al mismo tiempo la dificultad de llevar a cabo el sacrificio de los perros infectados en países sumamente sensibilizados con el bienestar animal (Desjeux, 1996; WHO, 1996). Por ello, las medidas de control se han centrado en acciones frente a los insectos vectores, la quimioterapia y la búsqueda de vacunas.

El diagnóstico temprano y el tratamiento de los pacientes humanos son esenciales, pero su impacto en la transmisión de la enfermedad será escaso si no se aborda conjuntamente al perro como reservorio y a los vectores (Dye, 1996; Palatnik de Sousa y col., 2001; Romero y Boelaert, 2010).

1.6.1. VECTOR

1.6.1.1. CONTROL VECTORIAL

El control vectorial supone un elemento muy importante en las estrategias globales de control de las principales enfermedades de transmisión vectorial (Townson y col., 2005). Para evitar la progresión de la transmisión de la LCan se deben adoptar estrategias que impidan la picadura del vector e incluso que reduzcan sus poblaciones (Alexander y Maroli, 2003; Solano-Gallego y col., 2009). Las siguientes acciones pueden ser llevadas a cabo:

- I) Evitar la presencia de hábitats favorables para los flebotomos en las proximidades de las viviendas, reduciendo los lugares de cría y acumulaciones

de materia orgánica (Killick-Kendrick, 1999; Kishore y col., 2006; Sharma y Singh, 2008).

- II) Protección de las viviendas y de las casetas de los perros con telas mosquiteras apropiadas (Miró y col., 2007).
- III) Mantener al perro en el interior de la vivienda, fundamentalmente desde el atardecer hasta el amanecer, durante la época de actividad del flebotomo (Zaffaroni y col., 1999; Martín-Sánchez y col., 2009; Gálvez y col., 2010).
- IV) Rociamiento de viviendas con insecticidas residuales (Alexander y Maroli, 2003; Sharma y Singh, 2008; Quinnell y Courtenay, 2009).
- V) Aplicación de insecticidas de uso tópico (collares, pipetas o aerosoles) en el perro (Alexander y Maroli, 2003; Miró y col., 2008; Quinnell y Courtenay, 2009).

La lucha antivectorial frente a los flebotomos mediante el uso de insecticidas sólo se puede emplear con los individuos adultos, debido al desconocimiento que se tiene de los lugares precisos donde se desarrollan las fases larvarias (Killick-Kendrick, 1999; Sharma y Singh, 2008). El uso extensivo de insecticidas para el control vectorial ha suscitado preocupación en lo concerniente a la toxicidad, aparición de resistencias, bioacumulación y los efectos adversos que pudieran tener tanto sobre el ambiente como en la salud de la población humana. Aunque los flebotomos son en general bastante sensibles a los insecticidas comúnmente utilizados en la lucha antivectorial, se han descrito resistencias, sobre todo cuando se han usado a gran escala (Alexander y col., 2009), particularmente al DDT (Singh y col., 2001), a la deltametrina y a la permetrina (Amalraj y col., 1999).

Los hábitats domésticos y peridomésticos son los más apropiados para el rociamiento con insecticidas (Alexander y Maroli, 2003; Sharma y Singh, 2008). La OMS recomienda el uso del DDT únicamente en fumigaciones intradomiciliarias (WHO 2011, van den Berg y col., 2012). El control intradomiciliario de los flebotomos debe ser completado con el uso de cortinas y telas mosquiteras tratadas con piretroides (Alexander y Maroli, 2003; Sharma y Singh, 2008; Quinnell y Courtenay, 2009).

1.6.1.2. PROFILAXIS

Las medidas de profilaxis van encauzadas a evitar la picadura del vector. El hábito de guardar a perro a humanos ya que funcionarían como un atrayente para los flebotomos. Por otro lado, en ambientes rurales, las aves de cría y otros animales domésticos en el interior de la vivienda podría favorecer la infección drían atraer a otros carnívoros silvestres que podrían ser reservorios de ciclos selváticos de LVZ promoviendo su acercamiento a humanos (WHO, 2010).

Una aproximación al control de la leishmaniosis desarrollada en los últimos años ha consistido en el uso de insecticidas tópicos en lociones o impregnando collares. Estos insecticidas reducen el número de picaduras de los flebotomos para proporcionar la protección individual del perro y disminuir la transmisión (Killick-Kendrick y col., 1997; Killick-Kendrick, 1999). Se ha descrito que el uso de estos collares impregnados con insecticida reduce la incidencia de la LV en humanos (Maroli y col., 2001; Gavvani y col., 2002; Otranto y col., 2007). Los mejores resultados se han obtenido con collares de cloruro de polivinilo impregnados con deltametrina (Scalibor®, Intervet, Schering-Plough, Alemania) (Halbig y col., 2000). En condiciones óptimas pueden perdurar hasta 6 meses (Killick-Kendrick y col., 1997). También es muy eficiente una solución de permetrina (EXspot®, Schering-Plough, Alemania), con la cual se han conseguido reducir exitosamente el número de picaduras, tanto con permetrina sola (Molina y col., 2001) como combinada con imidacloprida (Mencke y col., 2003; Miró y col., 2007b; Otranto y col., 2007). Estas mantienen su efectividad unas 3 semanas. Los aerosoles de permetrina disminuyen su eficacia a las 2 semanas de duración (Molina y col., 2001).

1.6.2. HOSPEDADOR

1.6.2.1. CONTROL DEL RESERVORIO CANINO

La OPS/OMS, sigue recomendando la eutanasia de los perros infectados por *L. infantum*; con o sin manifestaciones clínicas son el principal reservorio y transmisor de la enfermedad al humano, y al no existir hasta la fecha instrumentos para evitar que los perros infectados transmitan la enfermedad al hombre y a otros perros, la conducta indicada es el sacrificio humanitario de perros infectados (OPS, 2009). Aunque se reconoce que esta medida es de difícil implantación tanto por razones éticas como sociales (Desjeux, 1996; WHO, 2002). En la actualidad, la eliminación de perros infectados se lleva a cabo sistemáticamente en Brasil (Palatnik de Sousa y col., 2001; Romero y Boelaert., 2010), y eventualmente puede hacerse extensiva a otros países como Paraguay y Argentina (OPS, 2009; Palatnik de Sousa y Day, 2011).

Varios estudios correlacionan la disminución de la LVZ humana y/o canina con el sacrificio de perros seropositivos (Magalhães y col., 1980; Ashford y col., 1993; Jeronimo y col., 2000; de Oliveira y de Araujo, 2003; Palatnik de Dousa y col., 2004; Costa y col., 2007; Nunes y col., 2010). Exceptuando la región occidental de China, donde parece haberse erradicado la leishmaniosis combinando el rociamiento intradomiciliario con insecticidas y la eutanasia de los perros seropositivos (Shao, 1982; Zhi-Biao, 1989), los restantes programas de control a gran escala basados en la

eutanasia de perros infectados, han sido sólo parcialmente exitosos (Ashford y col., 1998).

Tanto en Bahía (Brasil) como en Creta (Grecia) se ha observado que la eliminación de los perros seropositivos no reduce la incidencia de la leishmaniosis, y actualmente siguen sufriendo un incremento constante (Moreira y col., 2004; Antoniou y col., 2009). La eficiencia de la eliminación de perros seropositivos para bajar la incidencia de la infección en humanos es cada vez más discutida (Paranhos-Silva y col., 1998; Dietze y col., 1997; Moreira y col., 2004; Dantas-Torres y Brandão-Filho, 2006; de Souza y col., 2008; Nunes y col., 2008; Quinnell y Courtenay, 2009; Romero y Boelaert, 2010) ya que la incidencia de la LV humana en Brasil se ha mantenido muy alta a pesar de la aplicación intensiva de esta estrategia en los últimos años. El problema que tienen estas campañas de control es que al basar el diagnóstico exclusivamente en la serología y en los signos clínicos de los animales, no se detectan los perros seronegativos con infección subclínica (Mateo, 2007). También puede deberse a la implicación de otros reservorios en el mantenimiento de la enfermedad, al lapso de tiempo desde la detección del animal infectado y su posterior sacrificio, o a la oposición del propietario a la eutanasia (Courtenay y col., 2002; Moreira y col., 2004; Dantas-Torres y Brandão-Filho, 2006; Nunes y col., 2008). Los modelos matemáticos sugieren que para disminuir la incidencia de los casos humanos, el control de vectores y la vacunación de perros serían más eficaces que el sacrificio de éstos últimos (Dye, 1996).

1.6.2.2. INMUNOTERAPIA EN EL PERRO

La utilización de vacunas frente a la LCan representaría, sin duda alguna, la estrategia idónea para el control de la LVZ (Davies y col., 2003), y se ha propuesto como la mejor medida coste/efecto (Tesh, 1995). La vacunación supondría, además, una mayor conformidad ante las medidas de control por parte del propietario del perro que un programa de sacrificio (Palatnik de Sousa y Day, 2011).

En la actualidad son muchos los estudios dirigidos al desarrollo de una vacuna frente a la infección por *Leishmania* capaz de inducir una inmunidad celular eficaz, algunos con resultados prometedores (Palatnik-de-Sousa, 2008). La adquisición de protección es teóricamente posible, ya que hay un gran número de perros infectados en áreas endémicas y sólo una determinada proporción desarrolla la enfermedad (Sideris y col., 1999; Solano-Gallego y col., 2000). También existe la evidencia de que algunos perros infectados de manera natural en estas áreas exhiben respuestas linfoproliferativas y de inmunidad celular protectora frente a *Leishmania* (Cabral y col., 1992; Cardoso y col., 1998). Además, la inducción de una inmunidad mediada por

células en perros infectados de manera experimental apoya la posibilidad de inmunizar contra *Leishmania* (Pinelli y col., 1994).

Las vacunas de **primera generación** consisten en preparaciones de parásitos de *Leishmania* vivos o muertos. Sin embargo, ante la posibilidad de que la vacunación con leishmanias vivas pudiera producir enfermedad (Aebischer y col., 1993), los mayores esfuerzos se han dirigido a la vacunación con parásitos muertos. Convit y col. (1986) fueron los pioneros en el uso de parásitos muertos. La formulación de promastigotes de *L. major* muertos autoclavados junto con BCG ha sido ensayada en el modelo experimental canino de LV, comprobándose que disminuye la tasa de seroconversión (Mohebali y col., 1998; 2004; Fallah y col., 2000). Un ensayo reciente llevado a cabo en Irán utilizando una dosis autoclavada de *L. major* con hidróxido de aluminio (alúmina) y BCG produjo una disminución en el número de casos de LCan en una región de alta incidencia (Mohebali y col., 2004).

Una **segunda generación** de vacunas con antígenos purificados de *Leishmania* parece ser más exitosa (Solano-Gallego y col., 2009). Estas se basan en preparaciones purificadas de subunidades de proteínas. Una representante de este grupo es la derivada de la fracción de la glicoproteína GP63 de *L. donovani* también conocida como FML (ligando fucosa-manosa) con saponina como adyuvante, y que es conocida comercialmente con el nombre de Leishmune® (da Silva y col., 2000; Borja-Cabrera y col., 2002; Nogueira y col., 2005). En perros, muestra eficacia tanto en el bloqueo de la transmisión de *L. infantum*, incluso a los 12 meses desde la inmunización, como en inmunoterapia para la enfermedad (Borja-Cabrera y col., 2004; Saraiva y col. 2006; Santos y col., 2007; Coutinho-Abreu y Ramalho-Ortigao, 2010; de Lima y col., 2010). Brasil es el primer país donde se ha comercializado Leishmune®, con la problemática, en un país donde la eutanasia de los perros seropositivos es obligatoria, de que es casi imposible diferenciar si los perros que presentan anticuerpos anti-*Leishmania*, los han generado por infección natural o por la propia vacuna (de Oliveira y col., 2003; Dantas-Torres y Brandão-Filho, 2006). Los antígenos secretados al sobrenadante por el cultivo de promastigotes de *L. infantum* (LiESAp), junto con muramil dipéptido (MDP) como adyuvante (Lemesre y col., 2005; Bourdoiseau y col., 2009), han mostrado una eficacia del 92% en perros infectados con *L. infantum* (Lemesre y col., 2007). Dentro de este grupo, la vacuna más recientemente desarrollada, y la única comercializada en Europa, es la llamada CaniLeish® (LiESP/QA-21, Virbac, Francia). Está compuesta por proteínas de excreción-secreción de *L. infantum* purificadas (LiESP), producidas en cultivo libre de suero y células por el IRD (Institut de Recherche pour le Développement) (Lemesre, 1993), y como adyuvante incluye una fracción altamente purificada de la saponina de

Quilaja saponaria (QA-21). Se presenta en 3 dosis cada 21 días y se ha podido observar que es capaz de inducir una respuesta inmune celular en menos de tres semanas desde la primera dosis (Moreno y col., 2012).

En cuanto a los antígenos recombinantes de *Leishmania* empleados como vacuna, la proteína quimérica antigénica multicomponente Q (formada por la fusión de fragmentos de las proteínas ácidas ribosomales Lip2a, Lip2b, P0 y la histona H2A) administrada junto con BCG, protegió a un 90% de los perros infectados de manera experimental con *L. infantum* (Molano y col., 2003). Más recientemente, el antígeno quimérico MML (formado por la fusión de LeIF, TSA y LmSTI1), formulado con los adyuvantes MPL-SE® y AdjuPrime®, no fue capaz de prevenir la infección por *L. infantum* ni la progresión de la LV en perros en condiciones naturales (Gradoni y col., 2005). La inmunización experimental con los antígenos H1 y HSPB1 ha mostrado una capacidad de protección baja/moderada frente a la infección experimental con *L. infantum* (Moreno y col., 2005). Dentro de este grupo se encuentra comercializada desde el 2008 en Brasil una vacuna denominada Leish-Tec®. Compuesta por el antígeno recombinante A2 de amastigotes de *Leishmania* y con saponina como adyuvante (Fernandes y col., 2008).

Las vacunas de **tercera generación** son preparaciones purificadas de ADN que consisten en un plásmido de expresión eucariota que contiene un gen del parásito. Comparando con las vacunas basadas en antígenos recombinantes, las vacunas de tercera generación con ADN son mucho más estables, tienen menor coste, son fácilmente manipulables y la posibilidad de combinar varios genes en un sólo candidato vacunal es muy prometedora (Palatnik-de-Sousa, 2008). Además, estas vacunas pueden ser administradas por vía subcutánea, no requieren adyuvantes y la inmunidad mostrada, en concreto la inducida por la vacuna con LACK, es más duradera que la inmunización con la proteína recombinante e IL-12 como adyuvante. La vacunación con ADN ha demostrado que produce una respuesta inmune humoral y celular duradera, que implica a las células T CD8+ (Gurunathan y col., 2000). Un ensayo de inmunización con una vacuna de ADN multicomponente formada por 10 antígenos produjo en los perros vacunados una respuesta celular patente y la segregación específica de IFN- γ (Saldarriaga y col., 2006). La inmunización con ADN de las cisteín proteinasas A y B de *L. infantum* produjo la ausencia de parásitos en médula ósea y respuestas linfoproliferativas altas con niveles elevados de ARNm de IFN- γ con una protección en el 90% de los perros (Rafati y col., 2005).

En la actualidad cabe destacar lo novedoso que resulta el diseño de otro tipo de vacunas que actúan sobre algunos componentes de la saliva de los flebotomos o del tubo digestivo del insecto (Palatnik-de-Sousa, 2008), como es el caso de la proteína

denominada maxadilano (Brodie y col., 2007) o el antígeno SP15 (Valenzuela y col., 2001).

1.6.3. PARÁSITO

1.6.3.1. QUIMIOPROFILAXIS EN EL PERRO

Se ha propuesto como una medida quimioproláctica en el perro el uso del alopurinol diariamente durante una semana o durante 12-18 meses. No obstante debe considerarse que su uso diario podría causar urolitiasis, entre otros efectos secundarios (Ginel y col., 1998; Saridomichelakis y col., 2005; Mateo, 2007).

1.6.3.2. QUIMIOTERAPIA EN EL PERRO

En lo que respecta a la quimioterapia de la LCan, los protocolos de tratamiento y el seguimiento clínico han evolucionado notablemente, pero los fármacos utilizados son básicamente los mismos desde hace años. De todos modos, gracias a la mejora de la asistencia veterinaria, las expectativas de curación clínica - no parasitológica - son mucho mayores que antes, aunque en ocasiones no sea posible impedir la recidiva originada en situaciones de inmunosupresión (estrés, enfermedades debilitantes etc.) (Baneth y Shaw, 2002).

El leishmanioestático por excelencia, por su inocuidad y eficacia, es el alopurinol (Zyloric®). El tratamiento prolongado con alopurinol es efectivo para evitar la remisión del cuadro clínico (Ginel y col., 1998). Su combinación con los antimoniales pentavalentes (Glucantime® y Pentostam®) que son los leishmanicidas más utilizados, es considerada la terapia más efectiva y de primera línea en el protocolo de actuación (Denerolle y Bourdoiseau, 1999) ya que ambos fármacos tienen un efecto sinérgico que potencia la eficacia, prolonga los periodos de remisión clínica y retrasa la aparición de recidivas (Ginel y col., 1998; Denerolle y Bourdoiseau, 1999; Baneth y Shaw, 2002; Mateo y col., 2009). Existen numerosos protocolos de administración respecto a la dosis/peso/intervalo entre dosis y duración del tratamiento ya que no existe consenso al respecto (Noli y Auxilia, 2005). La toxicidad de los antimoniales puede dar lugar a estibointolerancia, que se manifiesta tras las primeras administraciones, que aparece al final del tratamiento por efecto acumulativo. La toxicidad que se presenta en pacientes con alteraciones renales es mayor tanto en el perro (Zaghloul y Al-Jasser, 2004) como en el humano (Oliveira y col., 2009).

La miltefosina (Milteforán®) es recomendada junto con el alopurinol como alternativa a los tratamientos de primera línea para LCan ya que se administran vía

oral y no producen nefrotoxicidad (Manna y col. 2008b; Mateo y col., 2009; Miró y col., 2009; Solano-Gallego y col., 2009; Woerly y col., 2009).

La anfotericina B (Fungizona®) ha mostrado una buena eficacia, pero es muy poco utilizada en medicina veterinaria tanto por su elevado precio como por su modo de aplicación (perfusión endovenosa) y toxicidad (nefrotoxicidad y ototoxicidad) (Solano-Gallego y col., 2009), por lo que no es recomendada como primera línea de acción en el tratamiento de LCan (Solano-Gallego y col., 2009). Actualmente se están utilizando las formas liposomadas de anfotericina B (AmBisome®), con muy buenos resultados (Lamothe, 2001).

El debate suscitado ante la presencia de un perro enfermo siempre ha girado en torno a la disyuntiva de la eutanasia o el tratamiento. El tratamiento de los perros enfermos suele implicar una curación clínica de la enfermedad, reducción de la carga parasitaria y disminución de la infectividad de los flebotomos (Gradoni y col., 1987; Alvar y col., 1994; Guarga y col., 2000; Ribeiro y col., 2008). Hay que tener en cuenta que la eficacia del tratamiento depende en gran medida de la gravedad de los signos que presente el animal, presentando aquellos perros con insuficiencia renal un peor pronóstico (Solano-Gallego y col., 2009). Pero no existe hasta el momento un tratamiento efectivo para la LCan y los tratamientos disponibles no previenen las recaídas, con el consiguiente riesgo ya mencionado de generar parásitos resistentes (Baneth y Shaw, 2002; Ciaramella y Corona, 2003).

El tratamiento de los perros se practica intensamente en Europa (Alvar y col., 1994), aunque para los expertos de la OPS/OMS en América Latina “el tratamiento y la vacunación de perros con los productos disponibles a la fecha son desaconsejados por ser ineficaces y porque dificultan la aplicación de medidas de vigilancia y prevención de la enfermedad” (OPS, 2009).

2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN



2.1. ANTECEDENTES

En Argentina la LC y LMC son endémicas en 9 provincias, dónde han sido descritas 19 especies de Phlebotominae, 16 de *Lutzomyia* y 3 de *Brumptomyia* (Salomón, 1998; Spinelli y col., 1999). En el periodo comprendido entre 1923 a 2004 fueron descritos 17 casos de leishmaniosis con sintomatología visceral, dentro del área endémica de LC por *L. braziliensis* (ninguno de ellos en Misiones); 4 se consideraron importados; uno desde Italia (Acuña y col 1924), otro desde Yugoslavia (Inda y col., 1934), un caso debido a *L. mexicana* en un paciente con SIDA (Nocito y col., 2002) y un caso debido a *L. infantum* en la provincia de Mendoza, de origen desconocido (Martin-Sanchez y col., 2004). Los otros 13 se describieron como autóctonos de las Provincias de Salta, Jujuy, Tucumán, Santiago del Estero, El Chaco y Formosa, que fueron considerados como visceralizaciones de una LC inicial (Borzzone, 1926; Benitez, 1967; Fernandez, 1941; Fonso e Ink, 1947; Mazza y Cornejo, 1926; Wilde y col., 1956; Salomon y col., 2001). Por varios motivos, no se consideró una LV por *L. infantum* autóctona en el diagnóstico de los casos: i) la ausencia del vector de *L. infantum* en Argentina, *Lu. Longipalpis*. ii) el solapamiento geográfico de los casos en zona endémica de LC por *L. braziliensis* (Córdoba-Lanús), iii) sintomatología simultánea con LC y iv) la ausencia de caracterización del agente causal en la mayoría de los casos, llevó a deducir que estos eran debidos a la visceralización de una LC (Grimaldi y col., 1989; Campanini y col., 1993; Torno y col., 1995; Sinagra y col., 1997; Salomón y col., 2001). No se puede descartar que los casos de LV hayan sido debidos a *L. infantum* y que la transmisión sea debida a otras especies de *Lutzomyia* (Salomón y col., 2001). Se ha considerado también la existencia de focos enzoóticos de LV cuyo contacto con el hombre sea esporádico y excepcional (Salomón y col., 2001). En la comunidad internacional, se asume que en Argentina existen focos endémicos o esporádicos de LV zoonótica probablemente debidos a *L. infantum* y que tienen al perro como reservorio (WHO., 1990).

Sin embargo la primera captura de *Lu. Longipalpis* en el país data de 1951 en el municipio de Candelaria (Misiones) (Duret, 1952) y hasta 50 años después no se volvió a tener constancia de esta especie en la zona. El segundo hallazgo tuvo lugar en Corpus (Misiones) en el año 2000 (Salomón y col., 2001). Ya en 2006, se colectaron 4 machos y 24 hembras en el departamento de Posadas (Misiones), y 2 hembras en Candelaria (Misiones) (Salomón y col., 2008). Recientemente, se ha encontrado en la ciudad de Posadas (Misiones) una tasa de infección por *L. infantum* del 3.4% en 211 hembras de *Lu. Longipalpis* estudiadas (Acardi y col., 2010).

La emergencia de la LV humana en Argentina tuvo origen en 2006, en la ciudad de Posadas donde fue confirmado el primer caso autóctono de LV humana causada por *L. infantum*. La transmisión ha sido asociada con perros enfermos e identificación del principal vector (*Lu. longipalpis*) en la misma zona (Salomón y col., 2008). Misiones es un área endémica para LC causada por *L. braziliensis*, siendo ésta la única especie autóctona caracterizada hasta el 2009 en Argentina (No descrita en Posadas) (Marco y col., 2005). Aunque también han sido detectados casos humanos de LC por *L. amazonensis* y *L. guyanensis* (Aleixo y col., 2006).

En los últimos años, ha ocurrido en las inmediaciones de la ciudad de Posadas, y en la ciudad misma, una serie de cambios tanto ecológicos como demográficos que pueden haber favorecido el establecimiento de este nuevo foco de LVZ. Como son la deforestación indiscriminada sin políticas de reforestación y la construcción de una central hidroeléctrica (Yacyretá-apipé) en el Río Paraná, 100 km aguas abajo de Posadas. Estos cambios han supuesto una subida de 87 m. sobre el nivel del mar en los últimos 37 años (www.yacyreta.org.ar), que además de generar un gran anegamiento de áreas ribereñas en las áreas afectadas de Paraguay y Argentina, con una transformación del ecosistema local, han provocado el desplazamiento de una gran cantidad de población humana (relocalizaciones) hacia asentamientos periféricos, bajo condiciones de aislamiento y marginación. La deforestación en las inmediaciones de la ciudad en estos últimos años puede haber sido la causa de los cambios en la biología del vector, provocando la urbanización del mismo. En este contexto ambiental degradado, se encuentra una enorme población de perros callejeros o de vida semilibre sin ningún control sanitario. Estos cambios han podido favorecer la urbanización del vector, y junto con la existencia de reservorios susceptibles (perros) y la proximidad de la enfermedad en Paraguay y Brasil, pueden haber propiciado el establecimiento de la LVZ en Posadas.

Desde junio de 2006 se han notificado 80 casos de LV humana en la provincia de Misiones (37 en la ciudad de Posadas; 2 en 2006, 13 en 2007, 7 en 2008, 11 en 2009, 3 en 2010 y 1 en 2011), con 8 decesos a pesar del tratamiento. Existen además gran cantidad de denuncias y notificaciones de perros tanto infectados como enfermos (Ministerio de Salud de Misiones, comunicación personal).

2.2. JUSTIFICACIÓN

En el momento de inicio de la presente tesis doctoral se desconocía si se estaba ante la emergencia de LV por *L. infantum* o si se estaba observando la visceralización de LC por otras especies. También se desconocía si los primeros casos humanos eran casos aislados autóctonos o importados de los países vecinos (Paraguay y Brasil), en los que ya estaba identificada la LVZ por *L. infantum* como autóctona. Esto nos animó a estudiar el papel de los perros, considerados tradicionalmente como el principal reservorio de la LVZ, en la transmisión de estas formas de leishmaniosis visceral, así como a caracterizar molecularmente la especie o especies encontradas en los mismos.

3. OBJETIVOS



3.1 OBJETIVO GENERAL

Ante la emergencia de la leishmaniosis visceral humana en la ciudad de Posadas, el objetivo principal de la presente tesis doctoral es el estudio de la epidemiología de la leishmaniosis visceral canina en esta zona.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. OBJETIVOS DEL ESTUDIO 1. LEISHMANIOSIS CANINA EN LA CIUDAD DE POSADAS: ESTUDIO PILOTO

3.2.1.1. Determinar la implicación de los perros como reservorio de leishmaniosis visceral zoonótica en la ciudad de Posadas.

3.2.1.2. En el supuesto caso de que el objetivo número 1 fuese afirmativo, identificar y caracterizar la especie o especies de *Leishmania* circulantes.

3.2.2. OBJETIVOS DEL ESTUDIO 2. PREVALENCIA E INCIDENCIA ACUMULADA DE LA LEISHMANIOSIS CANINA EN LA CIUDAD DE POSADAS

3.2.2.1. Determinar la prevalencia de la infección por *L. infantum* en los perros domésticos de la ciudad de Posadas.

3.2.2.2. Calcular la incidencia acumulada de la infección por *L. infantum* en los perros domésticos de la ciudad de Posadas al año del muestreo de prevalencia.

3.2.2.3. Determinar los factores de riesgo que influyen en la infección por *L. infantum* en el perro.

3.2.3. OBJETIVOS DEL ESTUDIO 3. COMPARACIÓN DE DOS ESCENARIOS EPIDEMIOLÓGICAMENTE DIFERENTES: POBLACIÓN DISPERSA VS POBLACIÓN HACINADA

3.2.3.1. Comparación de los resultados de las técnicas parasitológicas directas e indirectas en dos poblaciones epidemiológicamente diferentes.

3.2.3.2. Determinar el grado de asociación entre las variables estudiadas y la infección por *Leishmania* en ambos escenarios.

3.2.3.3. Describir en ambos contextos epidemiológicos, la distribución de los canes expuestos e infectados en relación a los signos clínicos presentados y a los resultados de las pruebas diagnósticas.

3.2.3.4. Analizar la variabilidad genética de *L. infantum* en los perros de ambas poblaciones.

4. ESTUDIOS EXPERIMENTALES



ESTUDIO 1

LEISHMANIOSIS CANINA EN LA CIUDAD DE POSADAS: ESTUDIO PILOTO

4.1. LEISHMANIOSIS CANINA EN LA CIUDAD DE POSADAS: ESTUDIO PILOTO

4.1.1. OBJETIVOS

Ante la emergencia de la leishmaniosis visceral humana en la ciudad de Posadas, se planteó:

1. Determinar la implicación de los perros como reservorio de leishmaniosis en la ciudad de Posadas.
2. En el supuesto caso de que el objetivo número 1 fuese afirmativo, identificar y caracterizar la especie o especies de *Leishmania* circulantes.

4.1.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.2.1. Área de estudio

La ciudad de Posadas (27° 23' S; 55° 53' W), es la capital de la provincia de Misiones. Se encuentra ubicada sobre el margen izquierdo del río Paraná, en el sudeste de la Provincia de Misiones, en la región Nordeste de Argentina. Es la ciudad más poblada de Misiones y su centro administrativo, comercial y cultural, con una población estimada, a fecha del 2008, de 297.499 (98,8% viven en zona urbana y el 32,6% por debajo del umbral de pobreza). La superficie de la ciudad es de 324 Km², y está caracterizada por un clima subtropical húmedo con un total de lluvias anuales aproximadamente de 1.700 mm y una temperatura media de 21,5° C. (Gobierno de la Provincia de Misiones, 2008) (ANEXO I.1).

4.1.2.2. Estrategia de muestreo: Selección de animales

La selección de los animales se llevó a cabo en los meses de julio y agosto del 2006 y se basó en un muestreo de conveniencia de 110 perros procedentes de dos orígenes (figuras 4.1.1 y 4.1.2):

- a) 83 (75,5%) de los perros procedentes de dos refugios caninos localizados en las afueras de Posadas, los cuales admiten a perros abandonados de toda la ciudad; 59 (71,1%) procedían de una asociación sin ánimo de lucro "El Refugio" (Itaembé Miní) y 24 (28,9%) del Instituto Municipal de Salud Animal "IMUSA" (Arrollo "El Zaimán").

b) 27 (24,5%) perros con dueño procedentes de una clínica veterinaria local “Dame la Pata” los cuales habían asistido a consulta rutinaria.

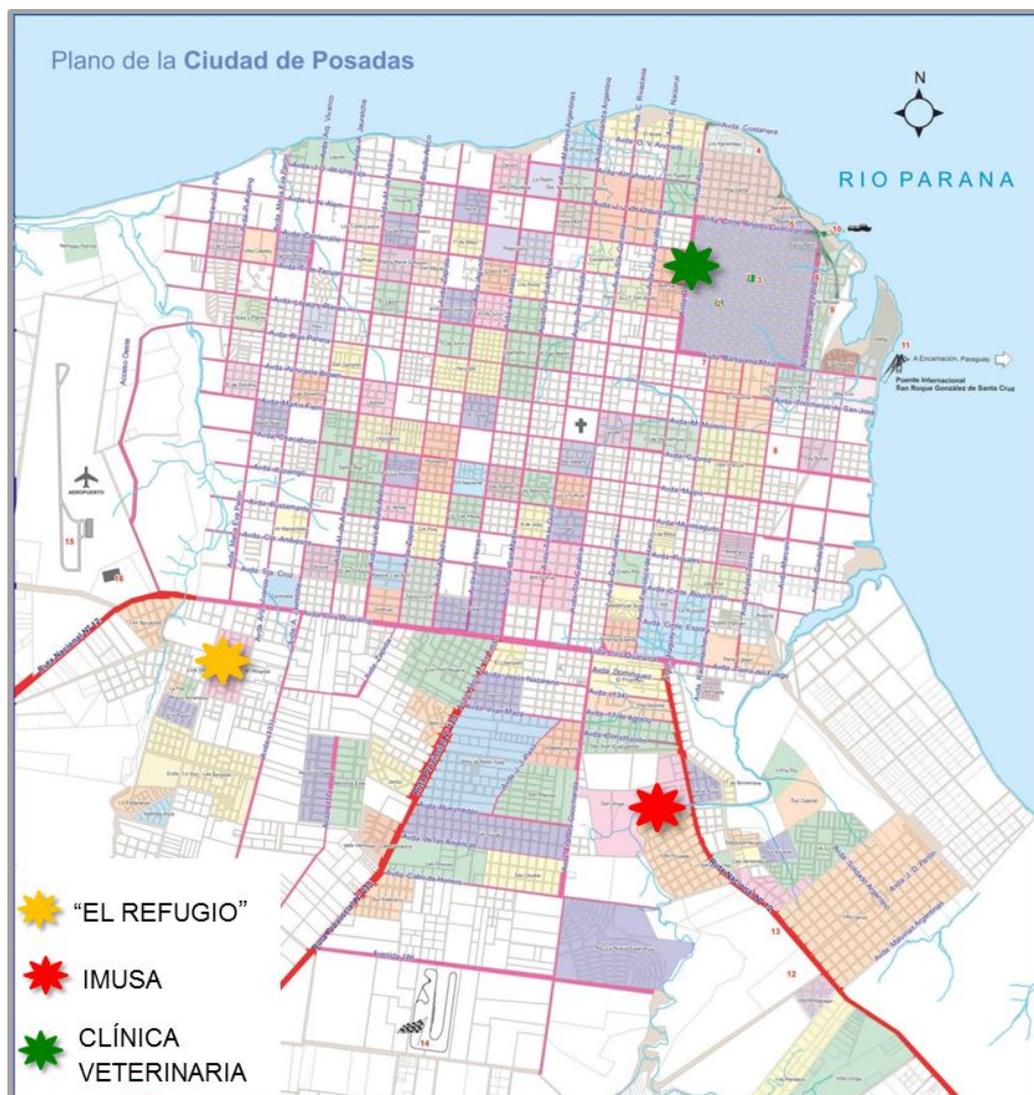


Figura 4.1.1. Mapa de la ciudad de Posadas con las ubicaciones de los puntos de muestreo (L Acosta).



Figura 4.1.2. Fotos de los puntos de los lugares de procedencia de los perros. A) "El Refugio", B) IMUSA, C) Clínica Veterinaria "Dame la pata" (L Acosta y MN Gutiérrez).

4.1.2.3. Exploración clínica

Cada perro fue examinado por una veterinaria local la cual recogió los signos clínicos compatibles con LCan usando un protocolo estandarizado (ANEXO I.4). Los perros fueron considerados como sintomáticos si tenían uno o más de los siguientes signos clínicos: linfadenopatía, onicogrifosis, lesiones cutáneas (alopecia, descamaciones, úlceras y alteraciones en la mucosa nasal), pérdida de peso, y conjuntivitis u otro signo ocular (figura 4.1.3). Los perros sin ninguno de estos signos clínicos fueron considerados asintomáticos. Otros parámetros fueron recogidos: edad, sexo, raza, número de perros en la casa, y lugar donde dormía el perro en la vivienda. Los perros fueron agrupados según los siguientes grupos de edad; 1 año o menor, de 2 a 5 años, de 6 a 10 años y mayor de 10 años.



Figura 4.1.3. Signos clínicos de los perros muestreados; **A)** Adelgazamiento, **B)** Onicogrifosis, **C)** Oculares (Uveítis), **D)** Descamaciones y alopecia, **E)** Úlceras, **F)** Alteraciones en la mucosa nasal, descamaciones y alopecia (L Acosta).

4.1.2.4. Toma de muestra

Después del examen clínico se tomaron dos muestras:

- a) Un ml de sangre periférica (SP) en tubos con EDTA del total de los perros estudiados. Para detección de ADN de *Leishmania* en sangre total, y detección de anticuerpos anti-*Leishmania* en el plasma obtenido tras centrifugación (5 min a 3.000 rpm) (figura 4.1.4).
- b) Aspirado de ganglio poplíteo (GP) en 94 de los 110 perros estudiados que fue diluido en 500 μ l de etanol al 70% como conservante y procesado para detección de ADN de *Leishmania* (figura 4.1.4).



Figura 4.1.4. **A)** Extracción de sangre periférica, **B)** Extracción de linfa del ganglio poplíteo (L Acosta).

Una vez obtenidas las muestras, éstas fueron conservadas a 4°C hasta su envío y procesamiento en el Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniosis, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, España.

4.1.2.5. Diagnóstico

4.1.2.5.1. Diagnóstico parasitológico indirecto

La presencia de anticuerpos anti-*Leishmania* en la población de estudio fue analizada mediante:

- a) Test de Inmunofluorescencia indirecta (IFI): Siguiendo la metodología descrita (Bray, 1985; ANEXO II.1.1).
- b) Test inmunocromatográfico rK39 (rK39-ICT): Se analizaron siguiendo las instrucciones del fabricante (ANEXO II.2.1).

4.1.2.5.2. Diagnóstico parasitológico directo

La detección de ADN de *Leishmania*, se realizó mediante PCR y secuenciación, según se describe a continuación:

a) Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó por el método convencional de extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol (ANEXO III.2.1) de las siguientes muestras: i) a partir del pellet obtenido después de la centrifugación de 100 µl SP (10 min de centrifugado a 6.000 rpm) y ii) del lavado con PBS de la dilución de la muestra de GP en etanol. El ADN obtenido se eluyó en 100 µl de agua estéril bidestilada (bd H₂O).

b) PCR y caracterización

b.1) Caracterización de género

La caracterización a nivel de género fue llevada a cabo en las muestras de SP y GP utilizando como diana una región del gen que codifica el ARN de la subunidad pequeña del ribosoma (*SSUrRNA*) mediante una PCR anidada (LnPCR) (Cruz y col., 2006) (ANEXO III.2.2.1). Y análisis de las secuencias obtenidas de los productos amplificados (ANEXO III.2.4.3 y III. 2.4.4).

b. 2) Caracterización de especie

La identificación de la especie de *Leishmania* se obtuvo tras analizar las secuencias obtenidas de los productos de amplificación de la PCR anidada de la región del espaciador intergénico 1 (ITS-1) (Schönian y col., 2003; ANEXO III.2.2.2 y III.2.4.3 y III.2.4.4).

4.1.2.6. Análisis estadístico

Los datos procedentes del examen clínico y resultados de los métodos diagnósticos empleados, fueron registrados en una hoja de Excel® (Microsoft Office 2003). La asociación entre las distintas variables estudiadas y la positividad a los diferentes métodos diagnósticos, se evaluó mediante el test de Chi-cuadrado de Pearson con el programa SPSS versión 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el p-valor fue <0,05.

4.1.2.7. Ética

Antes de la exploración clínica y posterior toma de muestra, se obtuvo un consentimiento informado de cada dueño, en el caso de perros domésticos, y de los responsables de ambas protectoras de animales. Los procedimientos fueron aprobados previamente por el comité de ética del Ministerio de Salud Pública de Misiones.

4.1.3. RESULTADOS

La frecuencia de las variables: procedencia, edad, sexo, y raza de los perros incluidos en el estudio se presentan en la tabla 4.1.1. La exploración clínica permitió clasificar a 34 de los 110 perros (30,9%) como asintomáticos, mientras que 76 (69,1%) presentaban uno o más de los signos clínicos relacionados con LCan.

	Frecuencia n (%)	SERO-pos n (%)	ADN-pos n (%)	Infectado n (%)
Origen				
Doméstico	27 (24,5)	14 (29,2)	14 (26,9)	18 (28,6)
Protectora	83 (75,5)	34 (70,8)	38 (73,1)	45 (71,4)
Sexo				
Macho	66 (60,0)	30 (62,5)	32 (61,5)	40 (63,5)
Hembra	44 (40,0)	18 (37,5)	20 (38,5)	23 (36,5)
Raza				
Raza definida	27 (24,5)	16 (33,3)	11 (21,2)	16 (25,4)
Mestizo	83 (75,5)	32 (66,7)	41 (78,8)	47 (74,6)
Grupo de edad				
≤ 1 año	23 (20,9)	12 (25,0)	12 (23,1)	15 (23,8)
2-5 años	55 (50,0)	24 (50,0)	29 (55,8)	34 (54,0)
6-10 años	18 (16,4)	5 (10,4)	7 (13,4)	7 (11,1)
> 10 años	14 (12,7)	7 (14,6)	4 (7,7)	7 (11,1)
Estatus clínico				
Asintomático	34 (30,9)	9 (18,7)	10 (19,2)	13 (20,6)
Sintomático	76 (69,1)	39 (81,3)	42 (80,8)	50 (79,4)
Total (%)	110 (100)	48 (100)	52 (100)	63 (100)

Tabla 4.1.1. Descripción detallada de los resultados parasitológicos directos e indirectos en relación a las variables estudiadas. **SERO-pos:** positivo por rK39-ICT y/o IFI. **ADN-pos:** positivo por LnPCR en SP y/o GP. **Infectado:** SERO-pos y/o ADN-pos.

La frecuencia de los diferentes signos clínicos en los perros sintomáticos se presenta en la tabla 4.1.2.

Signos clínicos	Frecuencia n/total (%)
Lesiones cutáneas	73/76 (96,0)
Linfadenopatía	68/76 (89,5)
Onicogriphosis	47/76 (6,8)
Pérdida de peso	38/76 (50,0)
Conjuntivitis	32/76 (42,1)

Tabla 4.1.2. Frecuencia de signos clínicos presentados en los 76 perros sintomáticos.

Todos los perros fueron analizados por rK39-ICT y/o IFI. Se observó que 42 de los 109 perros (38,5%) fueron positivos por rK39-ICT y 40 de 102 (39,2%) lo fueron por IFI. Los perros que resultaron positivos por uno o ambos métodos fueron considerados seropositivos, resultando una seroprevalencia del 43,6% (48/110) de los perros. En los

101 perros que pudieron ser testados por los dos métodos serológicos empleados, estos mostraron una concordancia del 90,1%.

Todos los perros fueron analizados por SP-LnPCR y/o GP-LnPCR. El ADN de *Leishmania* fue detectado en 23/109 (21,1%) de las SP analizadas y en 47/94 (50,0%) de los GP estudiados. La combinación de ambas técnicas detectó la presencia de ADN del parásito en 52/110 (47,3%) de los perros estudiados. En 93 de los perros pudo realizarse la PCR en ambas muestras biológicas (SP y GP) y la concordancia entre ellas resultó del 63,4%. Los perros fueron considerados como infectados cuando se detectaron anticuerpos anti-*Leishmania* y/o ADN en una o más de las muestras empleadas. Resultando una prevalencia total en el grupo de estudio del 57,3% (63/110). En la tabla 4.1.1, se muestran con detalle los resultados de los métodos serológicos y moleculares en relación a las variables recogidas (origen, sexo, raza, grupo de edad y estatus clínico) de los 110 perros estudiados. En la figura 4.1.5 se muestra un diagrama de flujo, en el que se pueden observar los datos del estatus clínico, así como el número de muestras procesadas por cada uno de los distintos métodos. El número de perros con uno, dos, tres o cuatro pruebas positivas de acuerdo con el estatus clínico, se muestra en la tabla 4.1.3.

Número de test positivos	Total n (%)	Asintomático n (%)	Sintomático n (%)
0	32 (37,6)	11 (55,0)	21 (32,3)
1	14 (16,4)	3 (15,0)	11 (16,9)
2	10 (11,7)	1 (5,0)	9 (13,8)
3	15 (17,6)	2 (10,0)	13 (20,0)
4	14 (16,4)	3 (15,0)	11 (16,9)
Total	85 (100)	20 (100)	65 (100)

Tabla 4.1.3. Número de perros analizados por los cuatro métodos diagnósticos (rK39-ICT, IFI, SP-LnPCR y GP-LnPCR), mostrando la positividad a uno, dos, tres o cuatro de los métodos usados en relación al estatus clínico del perro.

Respecto a la caracterización molecular, se obtuvieron las secuencias en 23 muestras de SP y en 45 muestras de GP, de 53 perros diferentes analizados por LnPCR. Por otro lado, se obtuvieron las secuencias de los amplicones de ITS-1 de 17 perros diferentes. Las secuencias obtenidas de LnPCR resultaron al 100% concordantes con el gen *SSUrRNA* del complejo de especies de *L. donovani* (*L. donovani*, *L. infantum*), mientras que las secuencias de los productos obtenidos de ITS-1 por PCR, coincidieron al 100% con las secuencias de ITS-1 de *L. infantum*.

No se encontró asociación estadísticamente significativa entre las variables “Infectado” y pertenecer a uno de los grupos de edad, sexo u origen ($p>0,05$). Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la infección por *Leishmania* y el estatus clínico del perro ($p<0,05$). Así como, entre el número de síntomas presentados por el perro y estar infectado. También observada entre los siguientes signos clínicos; linfadenopatía, onicogriphosis y conjuntivitis ($p<0,05$), mientras que en las variables “lesiones cutáneas” y “pérdida de peso” no se encontró asociación con la infección ($p>0,05$).

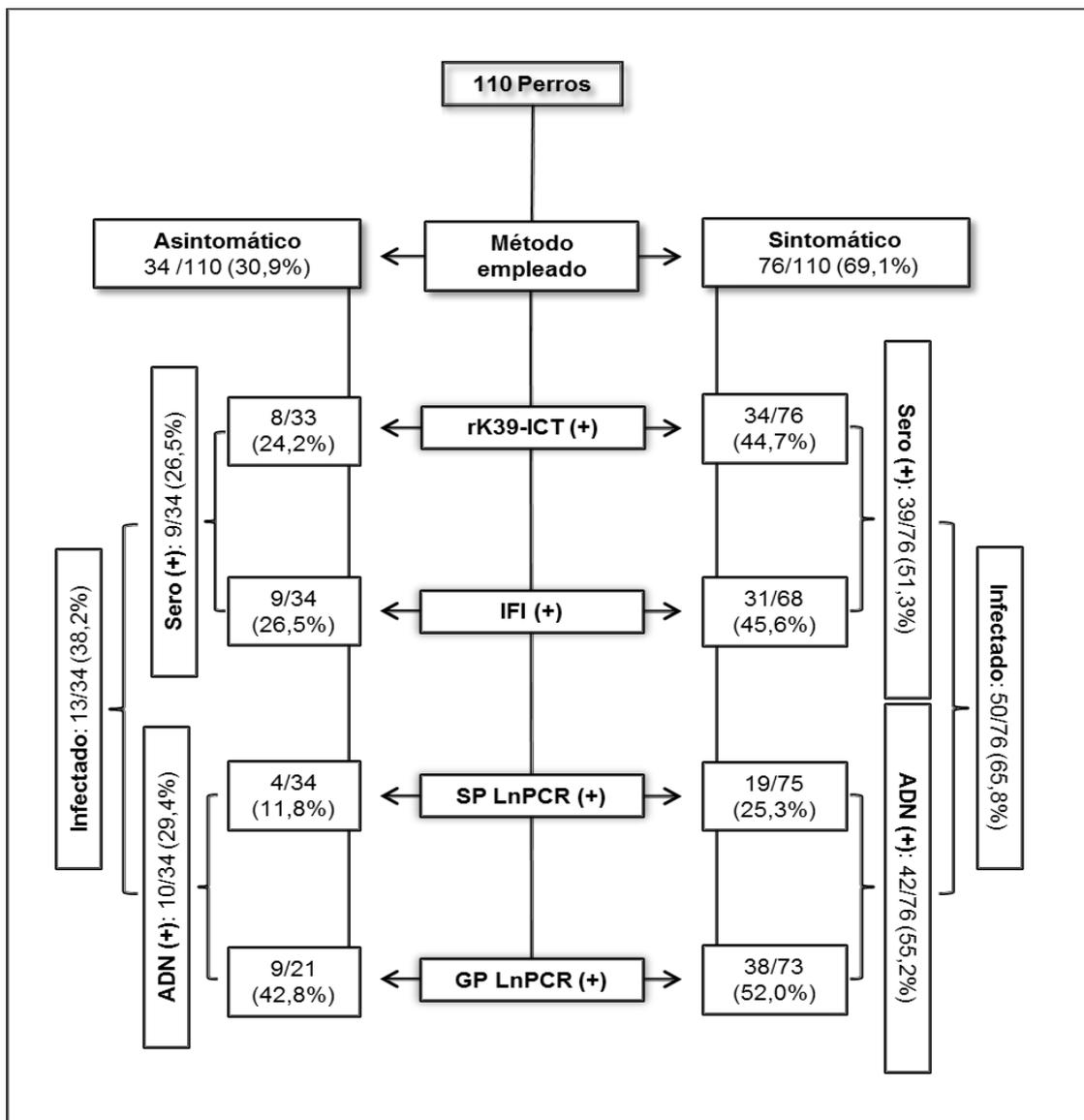


Figura 4.1.5. Diagrama de flujo que incluye los datos del examen clínico, el número de muestras procesadas por cada técnica diagnóstica y los resultados positivos de las mismas. **Sero (+):** seropositivo por rK39-ICT y/o IFI. **ADN (+):** LnPCR positiva en SP y/o GP. **Infectado:** Sero (+) y/o ADN (+).

4.1.4. DISCUSIÓN

Debido a la aparición del caso índice humano y ante la posibilidad de que los perros estuviesen implicados como reservorios del parásito en este posible foco emergente, se realizó el presente estudio. La infección por *Leishmania* fue confirmada por métodos parasitológicos directos y/o indirectos en 63 (57,3%) de los 110 perros estudiados. Sin embargo, siendo conscientes del sesgo en la elección de la población canina a estudiar (83 (75,5%) de los 110 perros estudiados eran abandonados), los resultados obtenidos no reflejan la prevalencia real de la infección por *Leishmania* en la población canina de la ciudad. Pero sugieren el papel de los perros como reservorio de la enfermedad en Posadas, e identifican hasta la fecha a *L. infantum* como única especie implicada.

Recientes estudios entomológicos han detectado la presencia de *Lu. longipalpis* en la ciudad de Posadas (Salomón y col., 2008), que junto con la presencia de perros infectados y los casos humanos confirmados podrían indicar que el ciclo de transmisión de LVZ se encuentra bien establecido. Situación que podría contribuir a la aparición de nuevos casos humanos. En Brasil, se ha observado que las epidemias humanas de LV van normalmente precedidas o concomitantes a altas tasas de infección en perros (Margonari y col., 2006; Werneck y col., 2007; Queiroz y col., 2009). La emergencia de más de 80 casos humanos desde el 2006 secunda esta posibilidad (Comunicación personal, Ministerio de Salud de Misiones).

Los perros sintomáticos infectados, son considerados los principales reservorios de LVZ, y en éste estudio representan 79,4% (50/63) de los perros infectados. Sin embargo, los perros asintomáticos infectados también tienen un importante papel en la transmisión de la infección por las dificultades en el manejo y establecimiento de medidas de control y detección de la infección en los mismos (Molina y col., 1994; da Costa y col., 2007; Michalsky y col., 2007). En este estudio representan el 20,6% (13/63) del total. Respecto a la asociación entre la infección y la sintomatología, en este estudio se corrobora la baja especificidad del diagnóstico clínico basado exclusivamente en la sintomatología relacionada con LCan; de hecho 34,2% (26/76) de los perros sintomáticos (uno o más de los signos clínicos anteriormente mencionados), presentaron resultados negativos tanto para pruebas serológicas como para PCR. De hecho, como es sugerido por diferentes revisiones bibliográficas, tanto en la práctica clínica como en estudios epidemiológicos, se deben llevar a cabo pruebas en laboratorio que sustenten el diagnóstico sintomatológico (Maia y Campino, 2008; Miró y col., 2008).

En áreas donde la LVZ es endémica, las prevalencias de infección en perros tienden a ser altas, y se observan elevadas proporciones de perros asintomáticos (Dantas-Torres y col., 2006). En el presente estudio, y contrariamente a lo observado en áreas tradicionalmente endémicas para LVZ, la mayoría de perros infectados presentaban uno o más signos clínicos compatibles con LCan. Esto podría ser debido a la reciente introducción de *L. infantum* en el área, en la cual la mayoría de los perros infectados, como si de una población “naïve” se tratase, serían susceptibles de desarrollar la enfermedad. No obstante, hay que considerar el sesgo cometido en la selección de la población, ya que la mayoría de los canes procedían de instituciones donde el hacinamiento y la frecuencia de ingreso de perros con enfermedades aumentan.

En los perros de este estudio no se observa un incremento en la seropositividad o en la detección de ADN del parásito en relación con la edad ($p > 0,05$). Contrariamente a lo descrito en otras áreas endémicas de LVZ donde se observa un incremento de la prevalencia de los perros seropositivos con la edad, y disminución posterior alrededor de ≥ 7 años (Martínez y col., 1990; Abranches y col., 1991; Fisa y col., 1999). Estos hallazgos podrían sustentar la hipótesis de la reciente introducción de *L. infantum* en la zona. Los resultados de los test diagnósticos empleados también secundan esta hipótesis. En una reciente revisión realizada por Baneth y colaboradores (Baneth y col., 2008), en un foco endémico tradicional, el número de perros PCR positivos excedería al de seropositivos; sin embargo en el presente estudio no existen diferencias significativas entre las tasas de infección detectadas por serología o PCR.

Respecto a los test serológicos empleados en el presente estudio (rK39-ICT e IFI) estos presentan una concordancia del 90,1%. La IFI ha sido considerada tradicionalmente el “*gold standard*” en el serodiagnóstico de la LCan (Gradoni 2002; Alvar y col., 2004), y diferentes test rápidos basados en el antígeno recombinante K39 han mostrado buenos resultados en estudios de campo (Lemos y col., 2008). De acuerdo con diferentes autores sus rangos de sensibilidad varían entre 85,5 a 90% para IFI, y 72 a 96,7% para rK39- ICT, y entre 94,7 a 100% la especificidad para IFI, mientras que en el rK39-ICT es del 61,75 al 100% (Reithinger y col., 2002; Mettler y col., 2005; Lemos y col., 2008; Maia y Campino, 2008). Sin embargo, Mettler y colaboradores (Mettler y col., 2005), han descrito la baja sensibilidad de ambos métodos en perros asintomáticos infectados, 29,4% para IFI y 52,9% para rK39-ICT. En nuestro estudio no observamos diferencias entre los perros asintomáticos y los sintomáticos; De los perros asintomáticos PCR positivos, fueron positivos por rK39-ICT

o IFI el 55,5% y 60% respectivamente. Mientras que en los perros sintomáticos PCR positivos se detectó una seropositividad por ambos métodos del 66,6%.

Las reacciones cruzadas con otros agentes infecciosos como *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Neospora caninum*, *Hepatozoon canis* y *Trypanosoma cruzi* también han sido descritas (Mancianti y col., 1996; Mettler y col., 2005; Lemos y col., 2008). Y algunos falsos positivos en los resultados de rK39-ICT han sido atribuidos a factores desconocidos en la sangre de los perros (Reithinger y col., 2002). En el presente estudio no podemos afirmar categóricamente el rol de las reacciones cruzadas con *T. cruzi* o *L. braziliensis*, pero es poco probable la presencia de la infección autóctona por estas especies en los perros de la ciudad de Posadas ya que estos parásitos no han sido descritos en esta zona.

El reciente foco de LV humana y canina establecida en la ciudad de Asunción, Paraguay (Canese, 2000; Cousiño, 2006), puede haber sido, por proximidad geográfica, la causa de la introducción de LV en el Nordeste de Argentina (Salomón y col., 2009). Aunque para corroborar esta hipótesis, deberían analizarse los genotipos circulantes de ambas localizaciones.

En lo referente a la caracterización molecular, esta es la primera vez que se describe y confirma la infección autóctona por *L. infantum* en Argentina.

ESTUDIO 2

PREVALENCIA E INCIDENCIA ACUMULADA DE LA LEISHMANIOSIS CANINA EN LA CIUDAD DE POSADAS

4.2. PREVALENCIA E INCIDENCIA ACUMULADA DE LEISHMANIOSIS CANINA EN LA CIUDAD DE POSADAS

4.2.1. OBJETIVOS

1. Determinar la prevalencia de la infección por *L. infantum* en los perros domésticos de la ciudad de Posadas.
2. Calcular la incidencia acumulada de la infección por *L. infantum* en los perros domésticos de la ciudad de Posadas al año del muestreo de prevalencia.
3. Determinar los factores de riesgo que influyen en la infección por *L. infantum* en el perro.

4.2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.2.1. Área de estudio

El área de estudio abarca toda la ciudad de posadas descrita en el estudio 1 (figura 4.2.1 y ANEXO I.1).



Figura 4.2.1. Vistas aéreas de la ciudad de Posadas (fuentes: www.yacyreta.org.ar; www.lineacapital.com.ar; www.traveliguazu.com.ar).

4.2.2.2. Selección de animales

Se llevó a cabo un muestreo aleatorio simple en los perros domésticos de la ciudad de Posadas. Para ello, se calculó *a priori* que serían necesarios entre 322 y 368 perros, con el fin de obtener una estimación real con un margen de error de $\pm 5\%$, y un intervalo de confianza del 95%. Este cálculo requirió de los siguientes supuestos: i) Una población estimada total de perros en la ciudad de 100.000 y ii) Una seroprevalencia estimada del 30 al 40%. Debido a la imposibilidad de obtener un listado de los perros domésticos elegibles de la ciudad para llevar a cabo un muestreo aleatorio simple, se tomó la determinación de que la unidad de muestreo más conveniente serían las viviendas particulares reconocidas en el "Registro de la propiedad de la Dirección General de Catastro". Este registro se encuentra dividido en 89.773 entradas (partidas), en su mayoría propiedades particulares urbanizadas (viviendas o locales comerciales). Aunque también se encuentran incluidas propiedades no urbanizadas como parques, solares, o zonas recientemente inundadas en los márgenes del río Paraná. Se realizó un pequeño estudio piloto con 50 direcciones al azar de entre el listado y se observó que: El 80% del territorio estaba urbanizado, el 20% de la población no tenía perro, y que el 20% de los encuestados no querían participar. Por lo que para minimizar los errores en la selección de los participantes en el muestreo, y prevenir la selección de errores en la introducción de datos en el registro (que no correspondieran a ninguna dirección real o fuesen partidas no urbanizadas, locales comerciales o viviendas en las que los dueños no tuviesen perro o que siendo dueños de perros éstos reusasen participar en el estudio), más un margen de 25 por si los supuestos no eran los correctos, se decidió seleccionar 600 partidas al azar de las casi 90.000 existentes en el listado del registro.

Para minimizar pérdidas, se decidió *a priori* que si la propiedad inicial seleccionada no era elegible (un local comercial, baldío, una vivienda sin perro o que teniendo perro el dueño rehusase participar), se pasaría a la vivienda contigua de la derecha. Y en el caso en que en la propiedad elegida hubiese más de un perro, se ofrecería el diagnóstico a todos, mientras que sólo uno al azar sería incluido en el estudio. Finalmente, de las 600 partidas seleccionadas, 349 perros pudieron ser incluidos en el estudio. Una descripción detallada del proceso de selección se muestra en la figura 4.2.2.

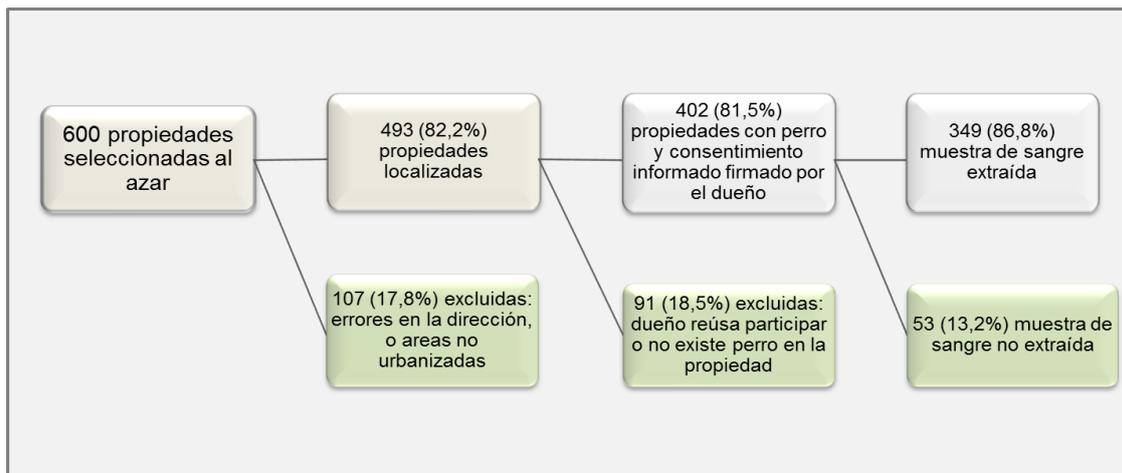


Figura 4.2.2. Descripción del proceso de selección de los perros para el muestreo aleatorio simple.

El muestreo aleatorio simple en los perros domésticos de la ciudad de Posadas se llevó a cabo desde del 1 de octubre al 30 de noviembre de 2009 (ver figura 4.2.3).



Figura 4.2.3. Fotografías de las distintas zonas de la ciudad en dónde se llevó a cabo el muestreo (L Acosta).

Para estimar la incidencia acumulada de la infección por *L. infantum* en los perros domésticos de la ciudad de Posadas, en 2010 se recurrió a los perros negativos por todas las técnicas procedentes del muestreo aleatorio simple del estudio de prevalencia realizado en el 2009. Finalmente 124 perros fueron incluidos en el estudio (figura 4.2.4). El muestreo para el cálculo de la incidencia acumulada se realizó del 1 al 15 de octubre de 2010.

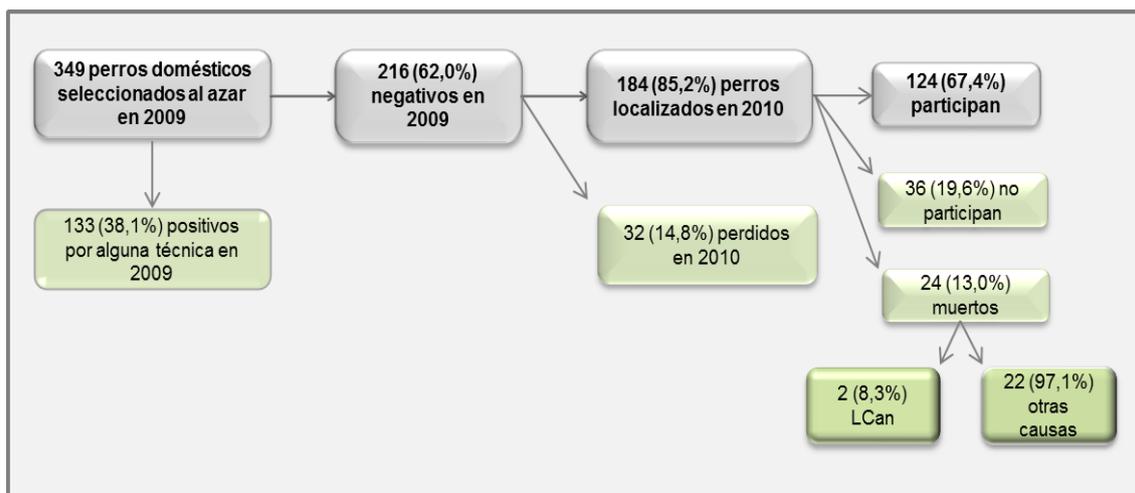


Figura 4.2.4. Descripción detallada del proceso de selección de los perros para el muestreo de incidencia acumulada.

4.2.2.3. Exploración clínica

Cada perro fue examinado por el veterinario/a, quienes recogieron los signos clínicos compatibles con LCan usando un protocolo estandarizado (ANEXO I.4). Los perros fueron considerados como sintomáticos si tenían uno o más de los siguientes signos clínicos: linfadenopatía, onicogrifosis, alopecia, descamaciones, úlceras, alteraciones en la mucosa nasal (trufa dañada), signos oculares (conjuntivitis, uveítis u otros), pérdida de peso, caquexia, hemorragias, hepatomegalia, esplenomegalia y apatía (figura 4.2.5). Los perros que no presentaron ninguno de los signos clínicos descritos fueron considerados como asintomáticos.

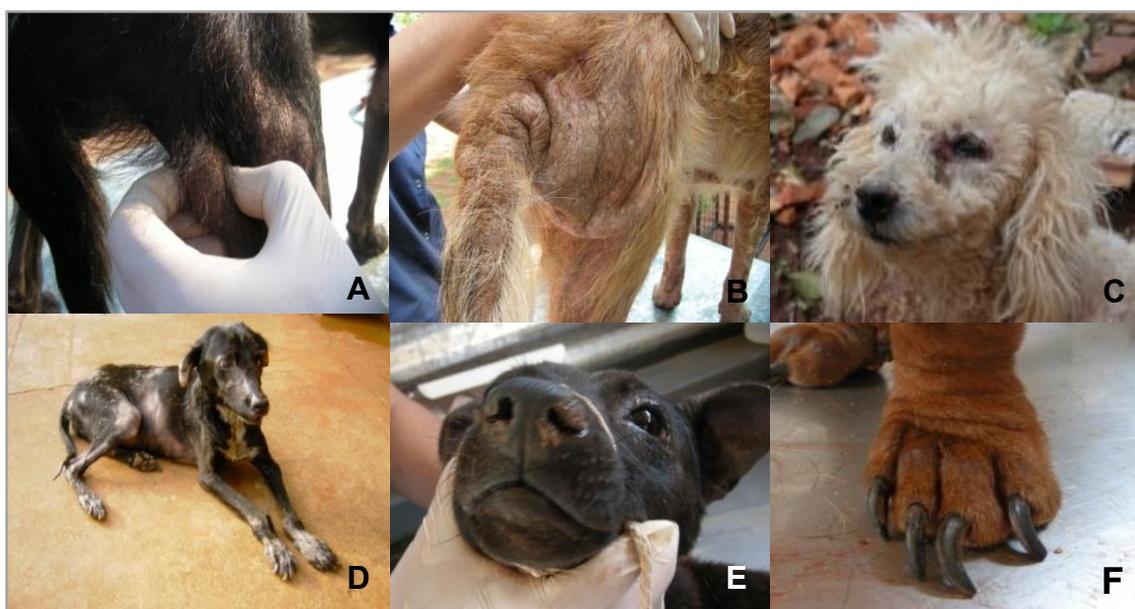


Figura 4.2.5. Signos clínicos: **A)** Linfadenopatía, **B)** Lesiones cutáneas, **C)** Lesiones oculares, **D)** Lesiones cutáneas y caquexia, **E)** Lesiones cutáneas y epistaxis, **F)** Onicogrifosis (L Acosta).

Otros parámetros como edad, sexo, raza, número de perros en la casa, y lugar donde dormía el perro, fueron recogidos simultáneamente (ver ANEXO I.4). Los perros fueron agrupados según los siguientes grupos de edad; 1 año o menor, de más de 1 año a 5 años, de más de 5 años a 10 años y mayor de 10 años.

4.2.2.4. Toma de muestra

Después del examen clínico se tomaron dos tipos de muestras:

- a) Se colectó 0,6 ml de sangre periférica (SP) en un tubo colector (Multivette® 600 EDTA tubes, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Germany). Ya en el laboratorio de la Universidad Nacional de Misiones (UNaM), el plasma fue separado por centrifugación (5 minutos a 3.000 rpm).
- b) Aspirado de médula ósea (MO de la unión condrocostal) y/o aspirado de nódulo linfático del ganglio poplíteo (GP).

Tanto la extracción del aspirado de MO como la de GP, se realizó con una aguja de 0,8 X 25 mm de Ø, y una jeringuilla de 5 ml y se guardaron en fresco en criotubos de 3 ml. Ya en el laboratorio se tomó una alícuota de de 100 µl esta muestra para cultivo y a la fracción restante se le añadió 500 µl de etanol de 70% como conservante para posteriores estudios.



Figura 4.2.6. A) Extracción de sangre periférica, **B)** Extracción de médula ósea (L Acosta).

Todas las muestras (excepto los cultivos) fueron conservadas a 4°C en la UNaM hasta su envío al Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis, ISCIII, Madrid, España. Donde se conservaron a -20°C hasta su posterior análisis.

Para el estudio de incidencia acumulada se siguió el mismo protocolo establecido para el muestreo aleatorio simple de 2009, pero únicamente se extrajo una muestra de sangre periférica, en la que el plasma fue separado por centrifugación para posteriores estudios.

4.2.2.5. Diagnóstico

4.2.2.5.1. Diagnóstico parasitológico indirecto

La detección de anticuerpos anti-*Leishmania* en la población de estudio fue llevada a cabo por cuatro test serológicos diferentes:

a) Detección de anticuerpos anti-*Leishmania* mediante antígenos completos:

Test de Inmunofluorescencia indirecta (IFI): Se llevó a cabo a partir de 2 µl de plasma, y siguiendo la metodología estándar descrita por Bray, 1985 (ver ANEXO II.1.1).

Test de Aglutinación directa (DAT): Se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante a partir de 50 µl de plasma (ver ANEXO II.1.2).

b) Detección de anticuerpos anti-*Leishmania* mediante antígenos recombinantes:

Test inmunocromatográfico rK39 (rK39-ICT): se usaron 25 µl de sangre periférica (“*in situ*” en el momento de la extracción) o plasma (posteriormente en el laboratorio del ISCIII después de centrifugar las muestras de sangre periférica) y se analizaron siguiendo las instrucciones del fabricante (ANEXO II.2.1).

ELISA rK39: Se realizó a partir de 10 µl de plasma (ver ANEXO II.2.2).

4.2.2.5.2. Diagnóstico parasitológico directo

4.2.2.5.2.1. Cultivo

De la muestra de aspirado de MO y/o GP se tomaron 100 µl en medio NNN (descripción en ANEXO III.1), conservado en estufa a 26°C hasta su envío al ISCIII, Madrid, España. Una vez en el ISCIII, los cultivos fueron pasados a medio fresco y se le realizaron pases sucesivos cada semana que fueron considerados positivos cuando se visualizaron promastigotes de *Leishmania* al microscopio óptico, si el resultado fue negativo después de 3 pases sucesivos (4 semanas de incubación), el cultivo se consideró negativo y se descartó.

4.2.2.5.2.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó por el método convencional de extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol a partir del pellet obtenido después de la centrifugación de MO o GP en etanol (10 min de centrifugado a 6.000 rpm). Siguiendo

la metodología descrita por Maizels y col., 1991, con pequeñas modificaciones (ver ANEXO III.2.1). El ADN obtenido se eluyó en 100 µl de H₂O bd.

4.2.2.5.2.3. PCR y caracterización

a) PCR

La detección parasitológica fue realizada mediante una PCR directa, utilizando como región diana la región del espaciador intergénico 1 (ITS-1), usando los cebadores SAC y VAN2 descritos en el ANEXO III.2.2.2.

c) Caracterización de especie

La identificación de la especie de *Leishmania* se realizó tras analizar la digestión de los productos de amplificación con la enzima de restricción *HaeIII* (PCR-RFLP) (ver ANEXO III.2.4.2.1) y se confirmó tras analizar las secuencias obtenidas de los productos de amplificación de la PCR de la región del espaciador intergénico 1 (ITS-1) amplificada con los cebadores SAC/VAN2 (Schönian y col., 2003; ANEXO III.2.2.2, III.2.4.3 y III.2.4.4).

4.2.2.5.3. Criterios de positividad

Los criterios de positividad establecidos en el estudio de prevalencia para el diagnóstico parasitológico indirecto en un perro con anticuerpos anti-*Leishmania* fueron los siguientes:

- i) Positivo por las metodologías que usan antígeno recombinante (rK39-ICT sangre y/o suero, y/o ELISA rK39) y antígeno completo (IFI y/o DAT) simultáneamente.
- ii) El criterio de positividad para la técnica de ELISA se estableció a densidad óptica (DO) por encima del valor 0,13, como la media de las densidades ópticas de 25 perros negativos por todas las pruebas serológicas y parasitológicas realizadas, más tres veces la desviación estándar (Ver ANEXO II.2.2).
- iii) La dilución de corte para positividad del IFI se tomó como 1/160 y para el DAT la dilución 1/1600.

El criterio de positividad en el estudio de prevalencia para el diagnóstico parasitológico directo se estableció cuando un perro resultó positivo a la visualización de promastigotes en cultivo y/o detección de ADN de *Leishmania* en las muestras de ganglio poplíteo (GP) o médula ósea (MO).

Se definió como caso infectado por *Leishmania* cuando un perro resultó positivo mediante las técnicas parasitológicas indirectas (Antígenos recombinantes y

completos simultáneamente) y/o las técnicas parasitológicas directas (cultivo y/o PCR indistintamente).

El criterio de positividad para definir caso infectado por *Leishmania* (caso Leish) en el estudio de incidencia en lo referente al diagnóstico parasitológico indirecto fue: positivo por la técnica de rK39-ICT y positivo por IFI a partir de la dilución 1/160.

Se definió como caso LCan a los perros infectados por *Leishmania* que presentaran alguno de los signos clínicos descritos.

4.2.2.6. Análisis estadístico

Para calcular el número de perros necesario en el muestreo aleatorio simple y el índice Kappa para determinar la concordancia entre las técnicas diagnósticas utilizadas se usó el programa estadístico Epidat 3.1 (<http://dxsp.sergas.es>). Los datos procedentes del examen clínico y posteriores resultados de análisis diagnósticos fueron recopilados e introducidos en una hoja de Excel® (Microsoft, Redmond, WA, USA). La asociación entre las distintas variables recopiladas y la positividad a los distintos métodos serológicos utilizados se evaluó con el programa SPSS versión 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) mediante el test de Chi-cuadrado de Pearson o exacto de Fisher cuando fue necesario. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el p-valor fue <0,05.

4.2.2.7. Ética

Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada dueño antes de la exploración clínica y extracción de las muestras (ver ANEXO I.3). El protocolo de estudio fue revisado por el comité de bioética del Ministerio de Salud de Misiones, Argentina (Expediente: 6106-135-08; Comité de Bioética, División de Zoonosis de la Subsecretaría de Atención Primaria y Salud Ambiental Salud del Ministerio de Salud de Misiones; Resolución Ministerial N°: 2332/2008).

4.2.3. RESULTADOS

De los 349 perros analizados, 192 (55,0%) eran machos y 157 (45,0%) hembras. La edad de los perros estudiados abarcó desde los 4 meses a 16 años; con una media de edad de 4,9 años. Después del examen clínico, 204 (58,5%) perros fueron clasificados como asintomáticos mientras que 145 (41,5%) presentaron uno o más de los signos clínicos relacionados con LCan.

La descripción detallada de los resultados entre las diferentes técnicas serológicas utilizadas en relación a las variables estudiadas; sexo, grupo de edad,

raza, lugar dónde duerme el perro en la casa, número de perros en la casa y el estatus clínico en 2009, se puede ver en la tabla 4.2.1.

Respecto a la positividad de las técnicas serológicas que usan como antígeno una proteína recombinante de *Leishmania* (rK39), cuando el test ICT fue realizado en plasma, se obtuvieron 104 (29,8%) perros seropositivos, mientras que cuando el test se realizó directamente en sangre 67 (19,2%) perros resultaron positivos. Un total de 112 (32,1%) perros fue positivo en sangre y/o plasma. La concordancia entre el ICT en sangre y plasma fue del 59,6 % (50,1%-69,0%). Los resultados tras el estudio de concordancias entre técnicas se pueden ver en la tabla 4.2.4. Al analizar los plasmas por ELISA 72 (20,8%) perros resultaron seropositivos. Un total de 117 (33,5%) perros fueron positivos por rK39-ICT y/o ELISA. La concordancia entre ambas técnicas resultó del 63,6% (54,7%-72,5%).

Cuando se analizó la seropositividad por las técnicas que usan antígeno completo de *Leishmania* 78 (22,3%) perros fueron positivos por IFI en plasma y 64 (18,3%) por DAT. Un total de 80 (22,9%) resultaron seropositivos por IFI y/o DAT. La concordancia entre ambas técnicas resultó del 80,6% (72,8%-88,3%).

Al analizar los perros que fueron positivos conjuntamente a antígeno total y antígeno recombinante, finalmente se obtuvieron 70 (20,1%) perros positivos por ambas metodologías. La concordancia entre ambas resultó del 60,2% (51,2%-69,3%).

En lo referente a la positividad de las técnicas parasitológicas directas, en el 16,6% (43/258) de los cultivos se visualizaron promastigotes de *Leishmania*. Los resultados entre las diferentes técnicas parasitológicas directas utilizadas en relación a las variables estudiadas, se pueden ver en la tabla 4.2.2. Según el tipo de muestra resultaron positivos en cultivo 10,4% (13/125) muestras de GP y 15,8% (32/202) muestras de MO. Mientras que se detectó ADN de *Leishmania infantum* en el 16,8% (53/314) de los perros estudiados. Según el tipo de muestra se amplificó ADN en 11,2% (14/125) muestras de GP y 13,0% (41/314) de MO. Teniendo en cuenta a los perros positivos por ambas técnicas parasitológicas directas, en el 17,0% (55/322) de los perros se pudieron observar promastigotes en cultivo y/o ADN de *Leishmania* (ver tabla 4.2.3 y figura 4.2.7). La concordancia entre ambas técnicas resultó del 96,3% (92,6%-100%).

La prevalencia de la infección por *Leishmania* en los perros domésticos de la ciudad de Posadas resultó del 22,3% (17,6%-27,8%). Un total de 78 perros fueron diagnosticados como caso infectado por *Leishmania*. La concordancia entre las técnicas parasitológicas directas e indirectas resultó del 69,3% (59,3%-79,3%). La distribución espacial de los casos caninos positivos frente al total de perros estudiados en la ciudad de Posadas, se muestra en la figura 4.2.8.

	Frecuencia n (%)	ICT sangre n (%)	ICT plasma n (%)	ICT Total n (%)	ELISA n (%)	AG recomb n (%)	IFI n (%)	DAT n (%)	AG completo n (%)	SERO-pos n (%)
Sexo										
Macho	192 (55,0)	38 (56,7)	56 (53,8)	59 (52,7)	41 (56,9)	62 (53,0)	41 (52,6)	36 (56,2)	42 (52,5)	37 (52,9)
Hembra	157 (45,0)	29 (43,3)	48 (46,2)	53 (47,3)	31 (43,1)	55 (47,0)	37 (47,4)	28 (43,8)	38 (47,5)	33 (47,1)
Grupo de edad										
≤ 1 año	51 (14,6)	8 (11,9)	11 (10,6)	12 (10,7)	9 (12,5)	13 (11,1)	11 (14,1)	9 (14,1)	11 (13,7)	8 (11,4)
>1-5 años	173 (49,6)	40 (59,7)	58 (55,8)	62 (55,4)	37 (51,4)	63 (53,8)	41 (52,6)	35 (54,7)	41 (51,3)	39 (55,7)
>5-10 años	101 (28,9)	16 (23,9)	28 (26,9)	31 (27,7)	20 (27,8)	33 (28,3)	19 (24,3)	17 (26,6)	20 (25,0)	17 (24,3)
<10 años	24 (6,9)	3 (4,5)	7 (6,7)	7 (6,2)	6 (8,3)	8 (6,8)	7 (9,0)	3 (4,6)	8 (10,0)	6 (8,6)
Raza										
Raza definida	94 (26,9)	18 (26,9)	24 (23,1)	26 (23,2)	19 (26,4)	28 (24,0)	22 (28,2)	18 (28,1)	22 (27,5)	17 (24,3)
Mestizo	255 (73,1)	49 (73,1)	80 (76,9)	86 (76,8)	53 (73,6)	89 (76,0)	56 (71,8)	46 (71,9)	58 (72,5)	53 (75,7)
Donde duerme el perro										
Dentro	73 (20,9)	9 (13,4)	15 (14,4)	19 (16,9)	7 (9,7)	20 (17,1)	8 (10,2)	4 (6,2)	8 (10,0)	7 (10,0)
Fuera	263 (75,4)	57 (85,1)	85 (81,7)	89 (79,5)	64 (88,9)	93 (79,5)	68 (87,2)	58 (90,6)	70 (87,5)	61 (87,1)
Ambos	13 (3,7)	1 (1,5)	4 (3,9)	4 (3,6)	1 (1,4)	4 (3,4)	2 (2,6)	2 (3,2)	2 (2,5)	2 (2,9)
Número de perros/casa										
1	172 (49,3)	24 (35,8)	44 (42,3)	48 (42,9)	30 (41,7)	50 (42,7)	29 (37,2)	26 (40,6)	31 (38,8)	27 (38,6)
2	115 (32,9)	31 (46,3)	45 (43,3)	47 (41,9)	31 (43,1)	48 (41,0)	36 (46,1)	27 (42,2)	36 (45,0)	32 (45,7)
3	44 (12,6)	9 (13,4)	10 (9,6)	12 (10,7)	7 (9,7)	13 (11,1)	7 (9,0)	7 (11,0)	7 (8,7)	7 (10,0)
>3	18 (5,2)	3 (4,5)	5 (4,8)	5 (4,5)	4 (5,5)	6 (5,2)	6 (7,7)	4 (6,2)	6 (7,5)	4 (5,7)
Estatus clínico										
Asintomático	204 (58,5)	32 (47,8)	55 (52,9)	59 (52,7)	40 (55,6)	62 (53,0)	45 (57,7)	33 (51,6)	46 (57,5)	38 (54,3)
Sintomático	145 (41,5)	35 (52,2)	49 (47,1)	53 (47,3)	32 (44,4)	55 (47,0)	33 (42,3)	31 (48,4)	34 (42,5)	32 (45,7)
positivos/analizados	349 (100)	67/349 (100)	104/349 (100)	112/349 (100)	72/346 (100)	117/349 (100)	78/349 (100)	64/349 (100)	80/349 (100)	70/349 (100)

Tabla 4.2.1. Frecuencia de los perros positivos en relación a la seropositividad de las diferentes técnicas realizadas y a las variables estudiadas en el estudio de prevalencia de 2009. **ICT Total:** positivo por ICT en sangre y/o plasma; **Ag recomb:** positivo por ICT y ELISA; **Ag completo:** positivo por IFI y DAT; **SERO-pos:** positivo por Ag recombinante y Ag completo.

	Frecuencia n (%)	CULTIVO n (%)	PCR n (%)	PARA-pos n (%)	Infectado n (%)
Sexo					
Macho	192 (55,0)	27 (62,8)	33 (62,3)	33 (60,0)	41 (52,6)
Hembra	157 (45,0)	16 (37,2)	20 (37,7)	22 (40,0)	37 (47,4)
Grupo de edad					
≤ 1 año	51 (14,6)	7 (16,3)	9 (16,9)	9 (16,4)	10 (12,8)
>1-5 años	173 (49,6)	22 (51,2)	29 (54,8)	29 (52,7)	42 (53,8)
>5-10 años	101 (28,9)	13 (30,2)	13 (24,5)	15 (27,3)	20 (25,7)
<10 años	24 (6,9)	1 (2,3)	2 (3,8)	2 (3,6)	6 (7,7)
Raza					
Raza definida	94 (26,9)	13 (30,2)	17 (32,1)	18 (32,7)	22 (28,2)
Mestizo	255 (73,1)	30 (69,8)	36 (67,9)	37 (67,3)	56 (71,8)
Donde duerme el perro					
Dentro	73 (20,9)	1 (2,3)	3 (5,7)	3 (5,5)	8 (10,2)
Fuera	263 (75,4)	41 (95,4)	49 (92,4)	51 (92,7)	68 (87,2)
Ambos	13 (3,7)	1 (2,3)	1 (1,9)	1 (1,8)	2 (2,6)
Número de perros/casa					
1	172 (49,3)	16 (37,2)	19 (35,8)	21 (38,2)	32 (41,0)
2	115 (32,9)	21 (48,8)	25 (47,2)	25 (45,4)	34 (43,6)
3	44 (12,6)	3 (7,0)	5 (9,4)	5 (9,1)	7 (9,0)
>3	18 (5,2)	3 (7,0)	4 (7,6)	4 (7,3)	5 (6,4)
Estatus clínico					
Asintomático	204 (58,5)	22 (51,2)	27 (50,9)	29 (52,7)	43 (55,1)
Sintomático	145 (41,5)	21 (48,8)	26 (49,1)	26 (47,3)	35 (44,9)
Positivos/analizados	349 (100)	43/258 (100)	53/314 (100)	55/322 (100)	78/349 (100)

Tabla 4.2.2. Frecuencia de los perros positivos en relación a las diferentes técnicas parasitológicas directas empleadas, los casos totales de LCan y a las variables estudiadas en el estudio de prevalencia de 2009. **PARA-pos:** positivo por cultivo y/o PCR; **Infectado:** positivo mediante PARA-pos y/o SERO-pos.

	Frecuencia n (%)	CULTIVO n (%)	PCR n (%)	PARA-pos n (%)
GP	120 (37,3)	11 (25,6)	12 (22,6)	13 (23,6)
MO	197 (61,2)	30 (69,8)	39 (73,6)	40 (72,7)
GP/MO	5 (1,5)	2 (4,6)	2 (4,6)	2 (3,7)
Total	322 (100)	43 (100)	53 (100)	55 (100)

Tabla 4.2.3. Resultados del análisis parasitológico directo en ganglio poplíteo (GP), médula ósea (MO), ganglio poplíteo y médula ósea (GP/MO). **PARA-pos:** positivo por cultivo y/o PCR.

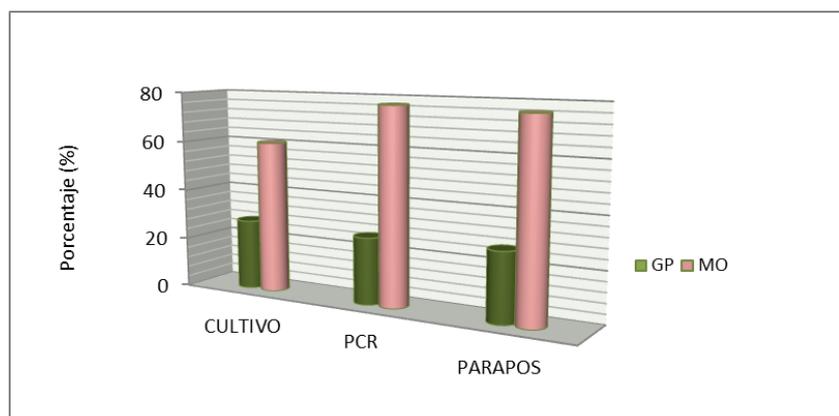


Figura 4.2.7. Representación gráfica de la tabla 4.3.3.

	ICT sangre	ICT plasma	ICT total	ELISA	Ag recomb	IFI	DAT	Ag completo	SERO-pos	Cultivo	PCR	PARA-pos	Infectado
ICT sangre	1												
ICT plasma	0,596	1											
ICT total	0,669	0,946	1										
ELISA	0,703	0,684	0,636	1									
Ag recomb	0,640	0,914	0,968	0,679	1								
IFI	0,644	0,661	0,614	0,796	0,587	1							
DAT	0,728	0,615	0,570	0,799	0,544	0,806	1						
Ag completo	0,665	0,677	0,630	0,815	0,602	0,948	0,826	1					
SERO-pos	0,737	0,743	0,694	0,894	0,664	0,897	0,852	0,915	1				
cultivo	0,662	0,485	0,465	0,654	0,433	0,647	0,781	0,653	0,689	1			
PCR	0,675	0,488	0,468	0,688	0,468	0,635	0,756	0,639	0,696	0,944	1		
PARA-pos	0,673	0,479	0,464	0,677	0,454	0,652	0,772	0,656	0,693	0,973	0,978	1	
Infectado	0,696	0,690	0,657	0,847	0,643	0,868	0,824	0,885	0,931	0,765	0,769	0,784	1

Tabla 4.2.4. Índice Kappa de las diferentes técnicas diagnósticas empleadas en el muestreo de prevalencia de 2009. **ICT Total:** ICT sangre y/o plasma; **Ag recomb:** positivo por ICT y ELISA; **Ag completo:** positivo por IFI y DAT; **SERO-pos:** positivo por Ag recomb y Ag completo; **PARA-pos:** positivo por cultivo y/o PCR; **Infectado:** positivo mediante PARA-pos y/o SERO-pos.

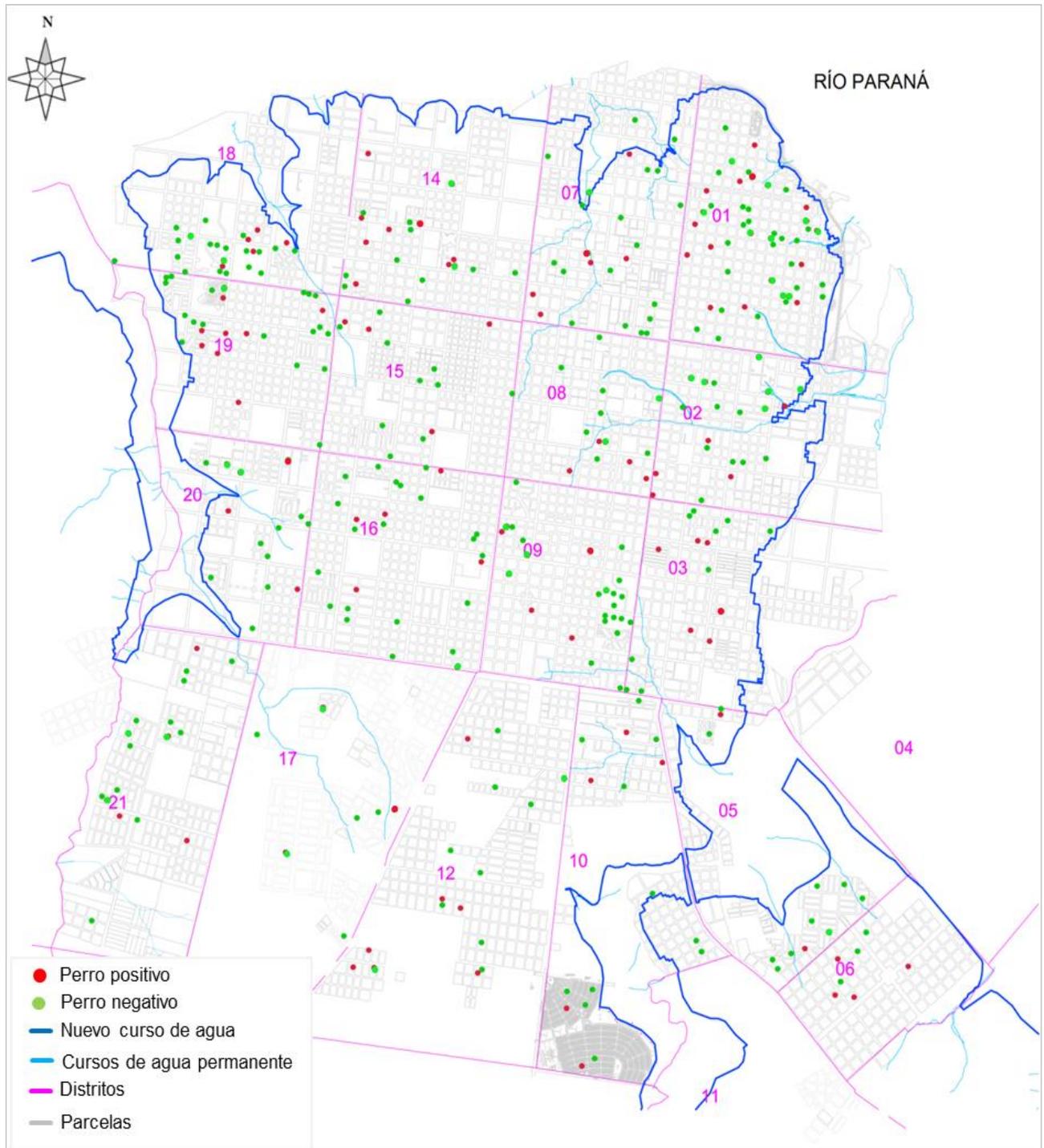


Figura 4.2.8. Distribución espacial de los perros muestreados aleatoriamente en 2009. Nuevo curso de agua a 83 metros sobre el nivel del mar.

De los 78 perros diagnosticados como caso infectado por *Leishmania*, en 47 (60,3%) de ellos las pruebas parasitológicas directas e indirectas fueron concordantes. Sin embargo, 23 (29,5%) perros fueron positivos serológicamente a antígenos completos y recombinantes simultáneamente, pero las técnicas parasitológicas directas resultaron negativas. Mientras que 8 (10,3%) perros resultaron positivos únicamente por las pruebas parasitológicas directas, siendo serológicamente negativos. De los 78 perros considerados como caso infectado por *Leishmania*; 53 (67,9%) perros fueron positivos por PCR, 43 (55,1%) por cultivo, 61 (78,2%) lo fueron por DAT, 70 (89,7%) por IFI, 66 (84,6%) por ELISA, 70 (89,7%) por ICT en plasma, 55 (70,5%) por ICT en sangre.

De los 204 perros asintomáticos, 62 (30,4%) fueron positivos por antígeno recombinante y 46 (22,5%) por antígeno completo. Finalmente se observó que 38 (18,6%) de ellos resultaron seropositivos por ambas metodologías (antígeno recombinante y completo). En 29 (14,2%) de estos perros asintomáticos se observaron promastigotes en cultivo o se amplificó el ADN de *Leishmania*. Un total de 43 (21,1%) perros asintomáticos fueron diagnosticados como caso infectado.

Respecto a los perros que presentaron uno o más de los signos clínicos, de los 145 perros sintomáticos, 55 (37,9%) fueron reactivos por alguna de las dos técnicas empleadas que usan antígeno recombinante, mientras que 34 (23,4%) lo fueron por alguna de las técnicas que usan antígenos completos de *Leishmania*. Resultando un total de 32 (22,1%) perros reactivos simultáneamente por ambas técnicas. En 26 (17,9%) de estos 145 perros sintomáticos se observaron promastigotes en cultivo o se amplificó el ADN de *Leishmania*. Un total de 35 (24,1%) perros sintomáticos fueron diagnosticados como caso de LCan.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las siguientes variables estudiadas y las técnicas que se nombran a continuación: La variable "Donde duerme el perro" con las técnicas de ELISA, DAT, SERO-pos, PCR, Cultivo, PARA-pos y Caso de LCan ($p < 0,05$). Así como, entre el "Tipo de muestra" (MO o G) respecto a la variable PCR y PARA-pos ($p < 0,05$).

Los resultados de los signos clínicos estudiados en 2009, se pueden observar en la tabla 4.2.5. El signo clínico más prevalente fue linfadenopatía, siendo observado en 124 (85,5%) de los 145 perros sintomáticos estudiados. Siendo considerados como caso de LCan 32 (25,8%) de los perros que la presentaban.

Por otro lado, 51 (35,2%) de los perros estudiados presentaron onicogriposis, 27 (52,9%) de ellos fueron diagnosticados como caso de LCan. De los 48 perros con descamaciones, 16 resultaron ser casos de LCan (33,3%). De los 44 perros que presentaron alopecia, 11 (25,0%) fueron considerados casos de LCan. De los 39

perros en los que se había observado una pérdida de peso, 12 (30,8%) de ellos resultaron casos LCan. De los 32 perros que presentaron hepatomegalia, 11 (34,4%) fueron considerados como casos de LCan. De los 31 perros que presentaron esplenomegalia, 11 (35,5%) fueron considerados casos de LCan. De los 31 perros que presentaron signos oculares, 11 (35,5%) fueron considerados como casos LCan. De los 28 perros en los que se observaron las mucosas pálidas, 5 (17,8%) de ellos fueron casos LCan. De los 5 perros que presentaron úlceras cutáneas, 5 (20,0%) de ellos fueron diagnosticados como casos de LCan. De los 11 perros que tenían hemorragias, 2 (18,2%) resultaron ser casos de LCan. De los 9 perros con apatía, 1 (11,1%) fue considerado como caso de LCan. De los 9 perros que tenían la trufa dañada, 3 (33,3%) resultaron casos de LCan. Finalmente, de los 4 perros en los que se observó caquexia, 1 (25,0%) fue considerado caso de LCan.

SÍNTOMAS	Frecuencia n (%)	Ag recomb n (%)	AG completo n (%)	SERO- pos n (%)	PARA- pos n (%)	CASO LCan n (%)
Linfadenopatía	124 (85,5)	47 (85,5)	30 (88,2)	29 (90,6)	24 (92,3)	32 (91,4)
Onicogrifosis	51 (35,2)	34 (61,8)	28 (82,3)	26 (81,2)	23 (88,5)	27 (77,1)
Descamaciones	48 (33,1)	18 (32,7)	14 (41,2)	14 (43,7)	12 (46,1)	16 (45,7)
Alopecia	44 (30,3)	14 (25,5)	12 (35,3)	11 (34,4)	6 (23,1)	11 (31,4)
Pérdida de peso	39 (26,9)	17 (30,9)	11 (32,4)	11 (34,4)	8 (30,8)	12 (34,3)
Hepatomegalia	32 (22,1)	14 (25,5)	11 (32,4)	11 (34,4)	7 (26,9)	11 (31,4)
Esplenomegalia	31 (21,4)	14 (25,5)	11 (32,4)	11 (34,4)	7 (26,9)	11 (31,4)
Oculares	31 (21,4)	14 (25,5)	11 (32,4)	11 (34,4)	8 (30,8)	11 (31,4)
Mucosas pálidas	28 (19,3)	8 (14,5)	6 (17,6)	5 (15,6)	2 (7,7)	5 (14,3)
Úlceras	25 (17,2)	7 (12,7)	5 (14,7)	5 (15,6)	1 (3,8)	5 (14,3)
Hemorragias	11 (7,6)	4 (7,3)	2 (5,9)	2 (6,2)	2 (7,7)	2 (5,7)
Apatía	9 (6,2)	3 (5,5)	1 (2,9)	1 (3,1)	0 (0,0)	1 (2,8)
Trufa dañada	9 (6,2)	3 (5,5)	3 (8,8)	3 (9,4)	2 (7,7)	3 (8,6)
Caquexia	4 (2,8)	2 (3,6)	1 (2,9)	1 (3,1)	0 (0,0)	1 (2,8)
Total (%)	145 (100)	55 (100)	34 (100)	32 (100)	26 (100)	35 (100)

Tabla 4.2.5. Positividad de los diferentes métodos empleados respecto a los signos clínicos estudiados en el muestreo de prevalencia de 2009. **Ag recomb:** positivo por ICT y ELISA; **Ag completo:** positivo por IFI y DAT; **SERO-pos:** positivo por Ag recomb y Ag completo; **PARA-pos:** positivo por cultivo y/o PCR; **Caso LCan:** Positivo mediante PARA-pos y/o SERO-pos.

Las diferencias encontradas entre la variable “Estatus clínico” y la positividad a los test diagnósticos realizados no resultaron estadísticamente significativas. Sin embargo, al analizar los signos clínicos individualmente se observó que las diferencias encontradas en el signo clínico “Onicogrifosis” respecto a todos los test diagnósticos

utilizados, fueron estadísticamente significativas. Así como entre las diferencias encontradas entre “Hepatomegalia” y “Esplenomegalia” con ELISA y DAT, y finalmente, entre la variable “Oculares” con la positividad al ELISA, y ser seropositivo.

Respecto al número de signos clínicos compatibles con LCan que se estudiaron en los perros de la ciudad de Posadas, el 53,1% (77/145) de los casos sintomáticos diagnosticados presentaban 1 ó 2 signos clínicos. Ver resultados en la tabla 4.2.6.

No. Signos	Frecuencia n (%)	Ag recomb n (%)	Ag completo n (%)	SERO-pos n (%)	PARA-pos n (%)	Infectado n (%)
0	204 (58,5)	62 (53,0)	46 (59,5)	38 (54,3)	29 (52,7)	43 (55,1)
1	46 (13,2)	20 (17,0)	10 (12,5)	9 (12,8)	6 (10,9)	9 (11,5)
2	31 (8,9)	10 (8,5)	6 (7,5)	5 (7,1)	6 (10,9)	7 (9,0)
3	17 (4,9)	6 (5,1)	3 (3,7)	3 (4,3)	3 (5,5)	3 (3,8)
4	16 (4,6)	3 (2,6)	3 (3,7)	3 (4,3)	4 (7,3)	4 (5,1)
5	7 (2,0)	2 (1,7)	1 (1,2)	1 (1,4)	1 (1,8)	1 (1,3)
6	7 (2,0)	5 (4,3)	3 (3,7)	3 (4,3)	3 (5,5)	3 (3,8)
7	6 (1,7)	3 (2,6)	3 (3,7)	3 (4,3)	1 (1,8)	3 (3,8)
8	6 (1,7)	2 (1,7)	2 (2,5)	2 (2,8)	0 (0,0)	2 (2,6)
9	4 (1,1)	2 (1,7)	2 (2,5)	2 (2,8)	2 (3,6)	2 (2,6)
10	1 (0,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
12	2 (0,6)	2 (1,7)	1 (1,2)	1 (1,4)	0 (0,0)	1 (1,3)
13	2 (0,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	349 (100)	117 (100)	80 (100)	70 (100)	55(100)	78 (100)

Tabla 4.2.6. Distribución de positivos por las distintas técnicas utilizadas respecto al número de signos clínicos que presentaban los perros en el estudio realizado en 2009. **No. Sig:** Número de signos clínicos; **Ag recomb:** positivo por ICT y/o ELISA; **Ag completo:** positivo por IFI y/o DAT; **SERO-pos:** positivo por Ag recombinante y Ag completo; **PARA-pos:** positivo por cultivo y/o PCR; **Infectado:** positivo mediante PARA-pos y/o SERO-pos.

Fueron identificados como infectados el 19,6% (9/46) de los perros que presentaban uno de los signos clínicos compilados, mientras que el 22,6% (7/31) de los positivos presentaban dos signos clínicos, de los que presentaban tres signos clínicos resultó positivo 17,6% (3/17), el 25,0% (4/16) de los que presentaban 4, el 14,3% (1/7) de los que presentaban 5, el 42,8% (3/7) de los que presentaban 6 signos clínicos, el 50,0% (3/6) resulto positivo de los que tenían 7 signos clínicos, 33,3% (2/6) de positivos de entre los que presentaban 8 signos, el 50,0% (2/4) de positivos de entre los que presentaban 9 signos clínicos de los estudiados, y el 50,0% (1/2) de entre los que presentaban 12 signos clínicos resultó positivo a LCan.

En el **estudio de incidencia acumulada de 2010**, de los 216 perros seleccionados como negativos por todas las técnicas en el muestreo aleatorio simple realizado en 2009, a 32 (14,8%) no se les pudo localizar. Finalmente se encontró a

184 (85,2%) de los perros, de los que 36 (19,6%) de los dueños no quisieron continuar con su participación en el estudio, 24 (13,0%) perros habían muerto por diferentes causas en el transcurso del año (en 2 (8,3%) la causa de la muerte fue LCan según sus respectivos veterinarios), y 124 (67,4%) de los dueños aceptaron participar en la segunda parte del estudio y que se le tomase una nueva muestra a su perro.

De los 148 perros cuyos dueños aceptaron participar en el estudio de incidencia de 2010, 24 de ellos habían muerto en el transcurso de año. La incidencia acumulada observada fue del 10,5% (4,7%-16,3%) por año (13/124), siendo el 6,4% (8/124) por ICT en sangre, 13,7% (17/124) por ICT en plasma y 10,5% (13/124) por IFI. La descripción detallada de los resultados entre las diferentes técnicas serológicas utilizadas en relación a las variables estudiadas en el estudio de incidencia en 2010; sexo, grupo de edad, raza, lugar dónde duerme el perro en la casa, número de perros en la casa y el estatus clínico se pueden ver en la tabla 4.2.7.

	Total n (%)	ICT sangre n (%)	ICT plasma n (%)	IFI n (%)	Infectado n (%)
Sexo					
Macho	66 (53,2)	4 (50,0)	10 (58,8)	6 (46,2)	6 (46,2)
Hembra	58 (46,8)	4 (50,0)	7 (41,2)	7 (53,8)	7 (53,8)
Grupo de edad					
≤ 1 año	1 (0,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
>1-5 años	61(49,2)	6 (75,0)	11 (64,7)	8 (61,5)	8 (61,5)
>5-10 años	48 (38,7)	2 (25,0)	5 (29,4)	4 (30,8)	4 (30,8)
>10 años	14(11,3)	0 (0,0)	1 (5,9)	1 (7,7)	1 (7,7)
Raza					
Raza definida	37 (29,8)	5 (62,5)	12 (70,5)	10 (76,9)	10 (76,9)
Mestizo	87 (70,2)	3 (37,5)	5 (29,4)	3 (23,1)	3 (23,1)
Donde duerme el perro					
Dentro	27 (21,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Fuera	91 (73,4)	8 (100)	17 (100)	13 (100)	13 (100)
Ambos	6 (4,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Número de perros/casa					
1	54 (43,5)	3 (37,5)	5 (29,4)	3 (23,1)	3 (23,1)
2	41 (33,1)	2 (25,0)	6 (35,4)	4 (30,7)	4 (30,7)
3	16 (12,9)	2 (25,0)	3 (17,6)	3 (23,1)	3 (23,1)
>3	13 (10,5)	1 (12,5)	3 (17,6)	3 (23,1)	3 (23,1)
Estatus clínico					
Asintomático	70 (56,5)	1 (12,5)	7 (41,2)	3 (23,1)	3 (23,1)
Sintomático	54 (43,5)	7 (87,5)	10 (58,8)	10 (76,9)	10 (76,9)
Total	124 (100)	8 (100)	17 (100)	13 (100)	13 (100)

Tabla 4.2.7. Frecuencia de los perros positivos en relación a la seropositividad de las diferentes técnicas realizadas y a las variables estudiadas, en el estudio de incidencia acumulada de 2010. **Infectado:** positivo por ICT en sangre y/o plasma e IFI.

La concordancia entre ICT al ser realizado en sangre e ICT en plasma resultó del 60,5% (37,7%-83,3%), entre ICT en plasma e IFI y/o Infectado (caso infectado) resultó del 74,1% (52,7%-95,6%), entre ICT en plasma e IFI y/o Infectado del 84,9% (70,5% - 99,3%). Entre IFI e infectado resultó del 100% (ver tabla 4.2.8).

	ICT sangre	ICT plasma	IFI	Infectado
ICT sangre	1			
ICT plasma	0,605	1		
IFI	0,741	0,849	1	
Infectado	0,741	0,849	1	1

Figura 4.2.8. Índice Kappa de las diferentes técnicas diagnósticas empleadas en el estudio de incidencia acumulada de 2010. **Infectado:** positivo por ICT en sangre y/o plasma e IFI.

La distribución de los perros positivos en 2010 se puede ver en la figura 4.2.9. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la positividad de las distintas técnicas utilizadas y las variables estudiadas, salvo en la variable “Habitat” y rK39 en plasma. Respecto a los signos clínicos se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la variable “Estatus clínico” e ICT sangre, IFI e “infectado”.

El 43,5% (54/124) de los perros estudiados resultaron sintomáticos, siendo seropositivos el 18,5% (10/54) de ellos. Mientras que de los 13 positivos por ambas técnicas (ICT e IFI), el número de perros sintomáticos supuso el 76,9% (10/13). Los resultados de los signos clínicos estudiados en 2010 se pueden observar en la tabla 4.2.9.

El signo clínico más prevalente fue linfadenopatía, siendo observado en 41 (75,9%) de los 54 perros sintomáticos estudiados. Siendo seropositivos 7 (17,1%) de los perros que la presentaban. Por otro lado, de los 24 perros con descamaciones, 7 (29,2%) resultaron ser casos de LCan. De los 23 perros que presentaron alopecia, 4 (17,4%) fueron considerados casos de LCan. De los 22 perros en los que se observaron las mucosas pálidas, 3 (13,6%) de ellos fueron casos de LCan. De los 21 perros que presentaron esplenomegalia, 6 (28,6%) fueron considerados casos de LCan. De los 17 de los perros estudiados que presentaron onicogriposis, 4 (23,5%) de ellos fueron diagnosticados como casos de LCan. De los 16 perros en los que se había observado una pérdida de peso, 6 (37,5%) de ellos resultaron casos de LCan. De los 15 perros que presentaron hepatomegalia, 5 (33,3%) fueron considerados como casos de LCan. De los 11 perros que presentaron úlceras cutáneas, 2 (18,2%) de ellos fueron diagnosticados como casos de LCan. De los 3 perros que tenían hemorragias, 1 (33,3%) resultaron ser casos de LCan. De los 3 perros que

presentaron signos oculares, 1 (33,3%) fue considerado como caso de LCan. Finalmente, no se observaron casos de LCan con apatía, caquexia o trufa dañada. Teniendo en cuenta los signos clínicos individualmente se encontró asociación estadísticamente significativa entre las variables “Descamaciones”, “Hepatomegalia”, “Esplenomegalia”, “Adelgazamiento” y la positividad a ICT en sangre, ICT plasma, IFI y ser caso de LCan.

Respecto al número de signos clínicos compatibles con LCan que fueron observados en el estudio de incidencia acumulada de 2010, el 55,6% (30/54) de los casos sintomáticos diagnosticados presentaba de 1 a 3 signos clínicos. Ver resultados en la tabla 4.2.10. Fueron diagnosticados como caso de LCan el 9,1% (1/11) de los perros que presentaban uno de los signos clínicos compatibles con LCan, mientras que el 25,0% (3/12) de los positivos presentaban tres signos clínicos, el 20,0% (1/5) de los que presentaban cuatro, el 33,3% (2/6) de los que presentaban cinco, el 33,3% (2/6) de los que tenían siete signos clínicos, y el 33,3% (1/3) de entre los que presentaban ocho signos clínicos resultó positivo. No se encontraron casos de LCan con dos, seis o nueve signos clínicos.

	Frecuencia n (%)	rK39 sangre n (%)	rK39 plasma n (%)	IFI n (%)	Caso LCan n (%)
Linfadenopatía	41 (75,9)	5 (71,4)	7 (70,0)	7 (70,0)	7 (70,0)
Descamaciones	24 (44,4)	4 (57,1)	7 (70,0)	7 (70,0)	7 (70,0)
Alopecia	23 (42,6)	2 (28,6)	4 (40,0)	4 (40,0)	4 (40,0)
Mucosas pálidas	22 (40,7)	3 (42,8)	3 (30,0)	3 (30,0)	3 (30,0)
Esplenomegalia	21 (38,9)	6 (85,7)	6 (60,0)	6 (60,0)	6 (60,0)
Onicogrifosis	17 (31,5)	3 (42,8)	4 (40,0)	4 (40,0)	4 (40,0)
Pérdida de peso	16 (29,6)	3 (42,8)	6 (60,0)	6 (60,0)	6 (60,0)
Hepatomegalia	15 (27,8)	5 (71,4)	5 (50,0)	5 (50,0)	5 (50,0)
Úlceras	11 (20,4)	2 (28,6)	2 (20,0)	2 (20,0)	2 (20,0)
Hemorragias	3 (5,6)	1 (14,3)	1 (10,0)	1 (10,0)	1 (10,0)
Oculares	3 (5,6)	1 (14,3)	1 (10,0)	1 (10,0)	1 (10,0)
Apatía	2 (3,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Caquexia	1 (0,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Trufa dañada	1 (0,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Sintomáticos	54 (100)	7 (100)	10 (100)	10 (100)	10 (100)

Tabla 4.2.9. Positividad de los diferentes métodos serológicos empleados respecto a los signos clínicos estudiados en los perros del estudio de incidencia de 2010. **Caso LCan:** positivo por rK39-ICT sangre y/o plasma e IFI.

No. Sig	Frecuencia n (%)	ICT sangre n (%)	ICT plasma n (%)	IFI n (%)	Infectado n (%)
0	70 (56,5)	1 (12,5)	7 (41,2)	3 (23,1)	3 (23,1)
1	11 (8,9)	1 (12,5)	1 (5,9)	1 (7,7)	1 (7,7)
2	7 (5,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
3	12 (9,7)	1 (12,5)	3 (17,6)	3 (23,1)	3 (23,1)
4	5 (4,0)	1 (12,5)	1 (5,9)	1 (7,7)	1 (7,7)
5	6 (4,8)	1 (12,5)	2 (11,8)	2 (15,4)	2 (15,4)
6	3 (2,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
7	6 (4,8)	2 (25,0)	2 (11,8)	2 (15,4)	2 (15,4)
8	3 (2,4)	1 (12,5)	1 (5,9)	1 (7,7)	1 (7,7)
9	1 (0,8)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	124 (100)	8 (100)	17 (100)	13 (100)	13 (100)

Tabla 4.2.10. Positividad de los diferentes métodos serológicos empleados, respecto al número de signos clínicos que presentaban los canes en el estudio de incidencia acumulada. **Infectado:** positivo por rK39-ICT sangre y/o plasma e IFI.

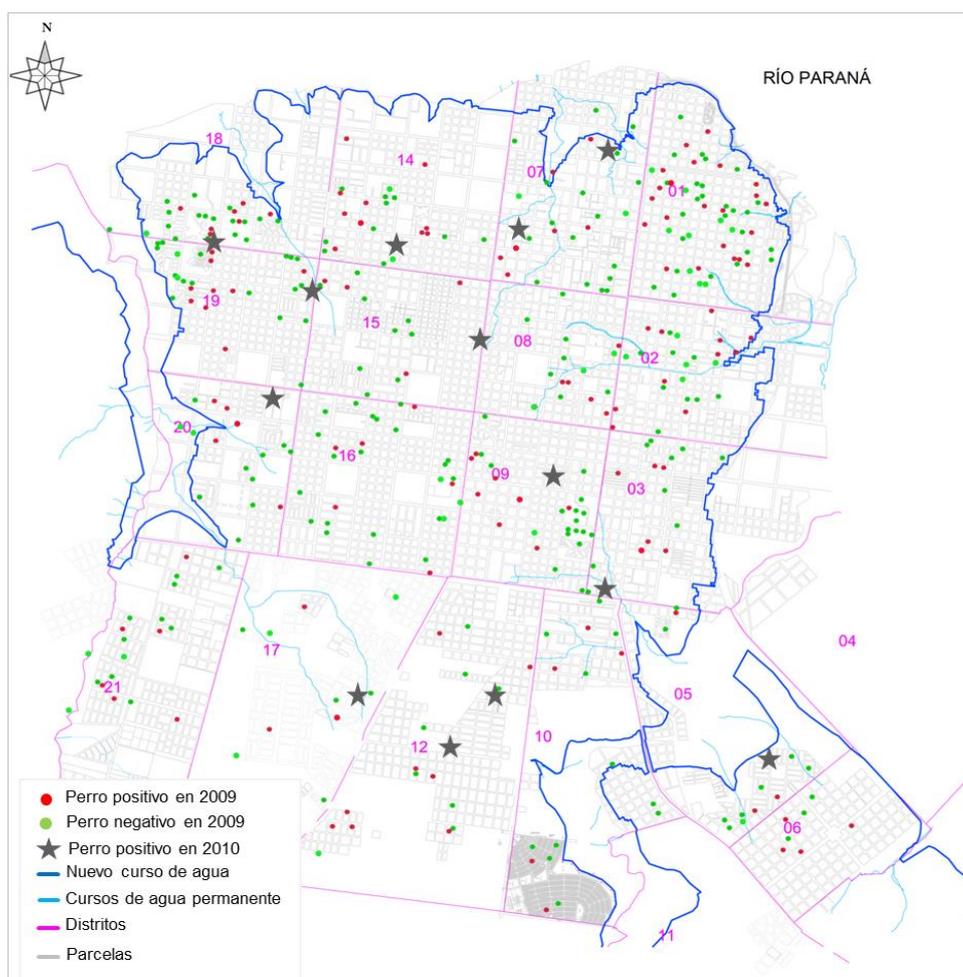


Figura 4.2.9. Distribución espacial de los perros muestreados aleatoriamente en 2009 y positivos en el estudio de incidencia acumulada de 2010.

Los resultados de la comparativa entre el muestreo aleatorio simple de 2009 y el estudio de incidencia realizado en 2010 respecto a las variables estudiadas y los diferentes signos clínicos observados se pueden ver en la figura 4.2.10 y 4.2.11.

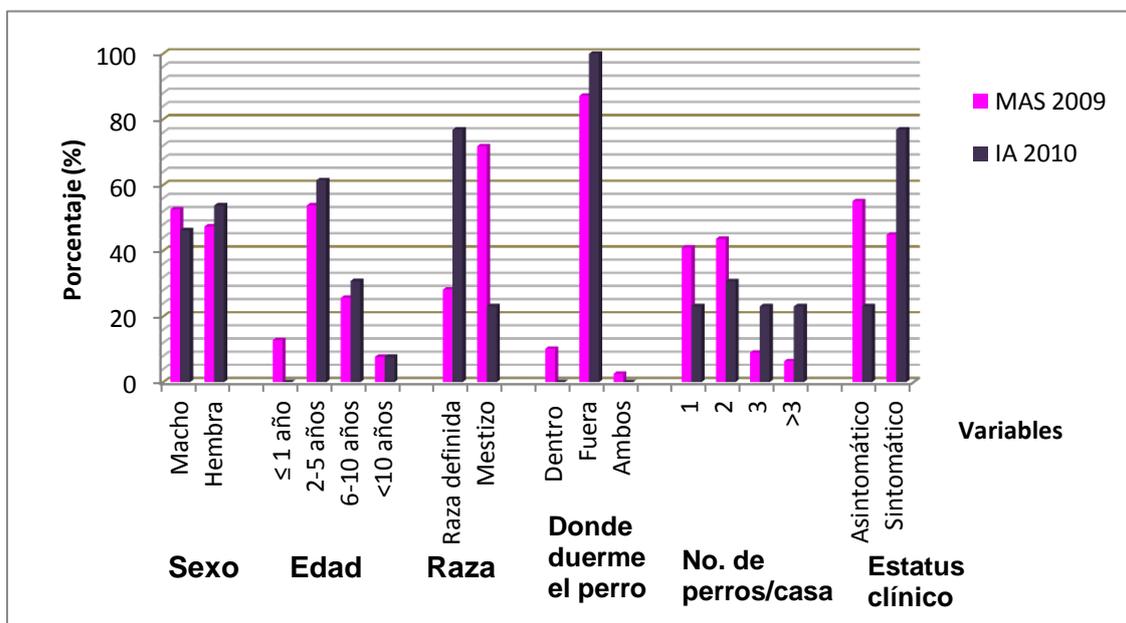


Figura 4.2.10. Comparación de resultados respecto a la positividad a las variables estudiadas respecto a ser caso infectado por *Leishmania*. **MAS 2009:** muestreo aleatorio simple de 2009; **IA 2010:** estudio de incidencia acumulada de 2010.

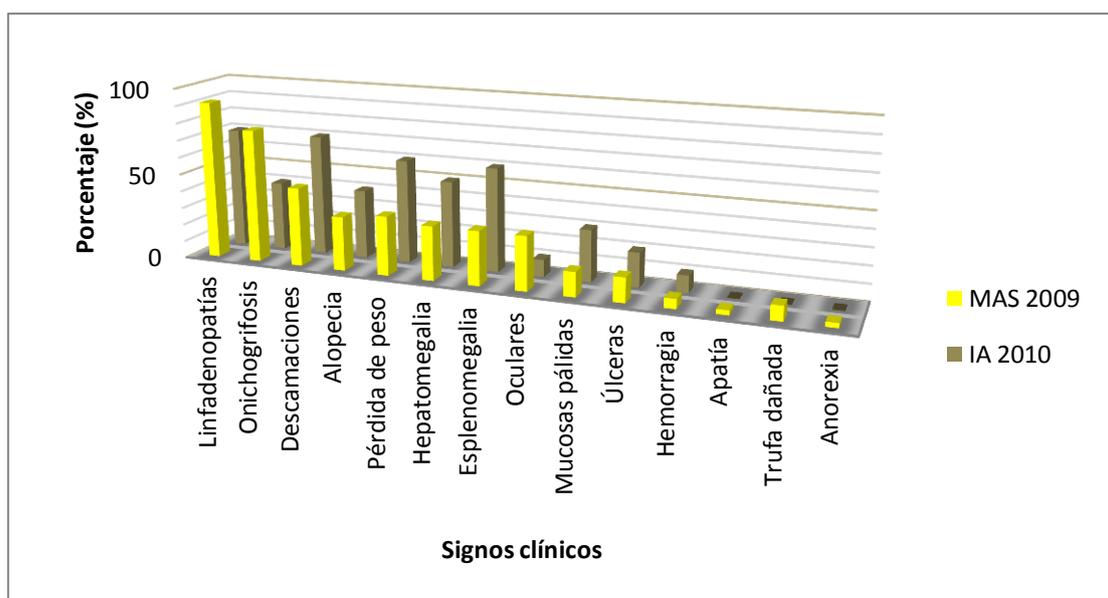


Figura 4.2.11. Comparación de resultados respecto a la positividad de los signos clínicos estudiados respecto a ser caso de LCan. **MAS 2009:** muestreo aleatorio simple de 2009; **IA 2010:** estudio de incidencia acumulada de 2010.

4.2.4. DISCUSIÓN

La prevalencia de la infección por *Leishmania* resultante del muestreo aleatorio simple llevado a cabo en los perros domésticos de la ciudad de Posadas fue del 22,3% (17,8%-26,9%). Esto sugiere que aproximadamente uno de cada cuatro perros de la ciudad podría estar infectado. Si bien la prevalencia observada es un poco más baja que el rango de entre el 25 al 75% descrito por Dantas-Torres en otras áreas endémicas tradicionales de América Latina (Dantas-Torres, 2009), su valor nos lleva a considerar que aquí la enfermedad podría estar bien establecida y Posadas puede ser considerada un área endémica de reciente introducción para LVZ.

El diseño de nuestro estudio permitió la obtención de una muestra representativa para determinar la prevalencia real de infección por *L. infantum* y de LCan en los perros domésticos de la ciudad de Posadas. Sin embargo, aunque no permite la comparación entre las diferentes áreas estudiadas de la ciudad, sí se puede observar un patrón de distribución homogéneo de los perros positivos en la misma. Debido a que la unidad de muestreo seleccionada fueron las viviendas de la ciudad, se puede observar la concentración de casos en áreas más densamente pobladas, mientras que en las menos pobladas los perros seleccionados muestran una distribución más dispersa. Esta observación contrasta con otros estudios en la misma zona, los cuales abogan por una distribución focal de los vectores asociada a una presencia de “clusters” de infección (Fernández y col., 2010; Acardi y col., 2010). No obstante, otros autores han observado que no es estrictamente necesario que haya una estrecha relación entre el patrón de distribución de los vectores y la ocurrencia de los casos caninos (Michalsky y col., 2009). La distribución homogénea de los perros infectados podría deberse a la movilidad de los perros, ya sea por ellos mismos o por sus dueños. Si los casos humanos fuesen punteados en un mapa, estos mostrarían una distribución espacial homogénea similar a la de los casos caninos (datos no publicados).

En la práctica, al diagnóstico de LCan se puede llegar por métodos parasitológicos directos e indirectos. La demostración del parásito por microscopía, cultivo o detección de ADN es la confirmación definitiva de la infección. Mientras que las pruebas serológicas son la herramienta del diagnóstico estándar para la detección de perros infectados en áreas endémicas, teniendo en cuenta consideraciones como el coste o la sensibilidad (Reithinger y Davies, 1999). Por ello, aunque para el diagnóstico clínico, no se pueden desligar las pruebas directas e indirectas, la prevalencia de la leishmaniosis es determinada generalmente por estudios seroepidemiológicos (Alvar y col., 2006). Una limitación de las técnicas serológicas

empleadas es que pueden presentar falsos positivos debido a reacciones cruzadas con otros agentes infecciosos (Troncarelli y col., 2008) o por factores desconocidos presentes en la sangre de los perros (rK39-ICT) (Reitinger y col., 2002; Alves y Bevilacqua, 2004; Alvar y col., 2004). En tal caso, se podría estar sobrestimando la prevalencia de la infección por *Leishmania*. Aunque en este caso es poco probable la existencia de reacciones cruzadas con *T. cruzi* o *L. braziliensis* ya que estos patógenos no han sido descritos en esta área por el momento (Ministerio de Salud de Misiones). Aun así, se decidió establecer como caso de infección por *Leishmania* a los perros que serológicamente fuesen positivos tanto a antígeno recombinante como completo, minimizando la posibilidad de reacciones cruzadas con *T. cruzi* y los falsos positivos de rK39-ICT por factores desconocidos en la sangre de los perros.

Respecto a la concordancia entre las técnicas en este contexto epidemiológico se puede observar que la concordancia entre ser caso de LCan es buena (0,60-0,80) respecto al ICT realizado tanto en SP como en plasma. Se puede observar que ambas poseen la misma magnitud (0,696), esto supone una ventaja en el terreno del ICT al ser realizado en sangre entera vs plasma, ya que el resultado se puede tener en el momento. Además supone un abaratamiento de los costes. i) No es necesario personal especializado (veterinario) para extraer un gran volumen de sangre, una punción con lanceta y utilizar unas gotas de sangre completa sería suficiente; ii) Ahorro en logística e infraestructura (material de extracción, transporte y almacenaje de las muestras); iii) Rapidez en la obtención de resultados ya que la sangre completa debe ser centrifugada o dejada en reposo a fin de separar el plasma o suero de elementos formes.

Respecto a las técnicas que usan antígeno recombinante y la idoneidad para determinar un caso de LCan, el ELISA es la más adecuada ya que muestra una muy buena concordancia (0,847) con los casos resultantes como infectados. El inconveniente del ELISA respecto al ICT es por un lado el costo y por otro lado lo laboriosa que resulta su realización. Pero si se dispone de los medios parece ser la técnica más adecuada dentro de este grupo. Teniendo en cuenta las técnicas que usan antígeno completo de *Leishmania* se puede observar que la concordancia con los casos infectados por *Leishmania* es excelente (0,885), aunque tanto el DAT (0,824) como la IFI (0,868) poseen concordancias por encima del 0,80%. La IFI parece ser la técnica más adecuada en este grupo, aunque si se tienen en cuenta los costos, dificultad de realización o su posible uso en terreno, el DAT es una buena alternativa a la IFI y su concordancia con las técnicas parasitológicas es superior a la observada con el resto de técnicas serológicas con valores de 0,756 con PCR y de 0,781 con el cultivo.

Las diferencias encontradas en los resultados del rK39-ICT en plasma vs sangre periférica, podrían ser explicados porque utilizando el mismo volumen de muestra, la concentración de anticuerpos es más elevada en plasma. Por otro lado, las diferencias encontradas entre ICT en plasma y las técnicas que usan antígenos completos (IFI y DAT), pueden deberse a que los antígenos diana son diferentes (un único antígeno recombinante vs antígeno total respectivamente).

Tanto el ICT basado en el antígeno recombinante rK39 como el DAT han sido propuestos como los dos test diagnósticos más adecuados para el diagnóstico de la LV en terreno (Chappuis 2006). Sin embargo, en el presente contexto epidemiológico la técnica de ICT en casos caninos infectados por *Leishmania* puede sobreestimar la prevalencia de la enfermedad en la zona. Debido a la cantidad de positivos que no se pueden corroborar por otras técnicas; 47 de los positivos en ICT y/o ELISA, no pudieron ser corroborados por las técnicas que usan antígeno total de *Leishmania*. Al igual que 10 de los positivos por antígenos completos no pudieron ser corroborados por la técnicas que usan antígeno recombinante y pueden ser debidos a reacciones cruzadas con otras patologías. También cabe destacar que usando solamente DAT, se puede estar infradiagnosticando la infección por *L. infantum* en los perros de Posadas, esto puede ser debido a que la técnica usada en el presente estudio usa antígeno total de *L. donovani*. Sería necesario, corroborar los resultados con la misma técnica pero usando antígeno total de *L. infantum*. En vista de los 70 perros positivos por las técnicas parasitológicas indirectas, se puede inferir que usando el ICT en plasma e IFI conjuntamente, se diagnostican 68 de los 70 perros seropositivos totales. Respecto a las técnicas parasitológicas directas tanto la PCR como el cultivo poseen una buena concordancia respecto a ser caso infectado por *Leishmania*, 0,769 y 0,765 respectivamente. Hay que tener en cuenta en este punto que sólo pudieron ser analizadas por esta metodología 314 muestras por PCR y 258 por cultivo. Se puede observar que existen diferencias estadísticamente significativas dependiendo del tipo de muestra usado para cultivo y/o PCR. En las muestras de médula ósea el porcentaje de positivos es mayor que en las muestras de ganglio poplíteo.

A destacar que al igual que sucedía en el estudio 1, el número de perros PCR positivos no supera el de los serológicamente positivos como postula Baneth y colaboradores en focos estables (Baneth y col., 2008).

En relación a la susceptibilidad a la infección, la mayoría de variables estudiadas (sexo, grupo de edad, raza o número de perros en la casa) no mostraron asociación significativa respecto a la infección por *Leishmania*. De hecho, en muchos otros estudios se ha encontrado que el sexo no es un factor determinante en relación a la susceptibilidad a la infección (Amela y col., 1995; Acedo-Sánchez y col. 1996; Morillas

y col. 1996; Cabrera y col., 2003; Franca-Silva y col., 2003; Cardoso, 2004; Andreotti y col., 2006; Santos y col., 2010). Aunque otros han encontrado mayor susceptibilidad en los machos (Fisa y col., 1999; Dantas-Torres, 2006; Queiroz y col., 2009). Respecto a los grupos de edad, no se observaron diferencias estadísticamente significativas y las magnitudes entre grupos en cuanto a la infección fueron similares. Hallazgos similares al presente estudio, han sido descritos por Franca-Silva (2003) y Andreotti (2006), los cuales sugieren que todas las edades están sujetas al mismo riesgo de infección. En nuestro estudio se observa que el 53,8% de casos se encuentran a partir del año a cinco años de edad, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas. En zonas tradicionalmente endémicas para LVZ, se ha observado un incremento de la prevalencia con la edad, observándose también que esta decrece a partir de los 7 años de edad. Esto podría ser debido al tiempo de exposición a los vectores con los años y el incremento de la tasa de muerte en los perros de más edad (Martínez y col., 1990; Abranches y col., 1991; Fisa y col., 1999). Nuestros hallazgos podrían ser consistentes con una reciente introducción de *L. infantum* en esta zona, donde los perros no habrían tenido el tiempo suficiente de exposición como para observar estas diferencias encontradas en otros focos tradicionalmente endémicos para LVZ.

La mayoría de los perros muestreados fueron mestizos (n=255, 73,1%), mientras que los de raza pura representaron solamente el 26,9% (n=94). Aunque de los 78 positivos 56 (71,8%) eran mestizos, en el presente estudio no se ha observado asociación estadísticamente significativa entre los casos de LCan respecto a las razas; los positivos entre los perros de raza representan el 23,4% (22/94) y entre los mestizos el 22% (56/255). En teoría todas las razas de perros deberían ser igualmente susceptibles a la infección por *Leishmania*, pero en la comunidad científica está aceptado que los Podencos Ibicencos y los perros mestizos podrían desarrollar cierto nivel de resistencia a la enfermedad (Solano-Gallego y col., 2000). Otros autores han encontrado un incremento en la susceptibilidad en algunas razas como el Pastor Alemán (Ranque y col., 1997; Miranda y col., 2008), Boxer (Ranque y col., 1997; Franca-Silva y col., 2003; Miranda y col., 2008), Rottweiler (Miranda y col., 2008), Cocker Spaniel (Franca-Silva y col., 2003; Rondon y col., 2008) y el Caniche (Rondon y col., 2008).

Por otro lado, sí que se ha observado asociación estadísticamente significativa entre la positividad a la infección y el hecho de que el perro duerma fuera de casa. Muchos estudios han señalado que los perros de guarda o los que tienen mayor acceso al exterior podrían estar en mayor riesgo de adquirir la infección tanto en áreas

urbanas como rurales (de Oliveira y de Araujo, 2003; Almeida y col., 2009; Aoun y col., 2009).

Una anotación interesante es que no se encontró incremento en el riesgo de la adquisición de la infección en casas con más de un perro. Incluso en las casas con más de un perro, la presencia de alguno de ellos infectado, no necesariamente implicaba la infección de los otros (datos no mostrados).

Muchos estudios han señalado la importancia de identificar a los portadores asintomáticos en áreas endémicas (Cabral y col., 1998; Sideris y col., 1999; Fisa y col., 1999; Franca-Silva y col., 2003; Alvar y col., 2004; Dantas-Torres y col., 2006; Rondon, 2008; Chargui, 2009; Solano-Gallego, 2009), que en el presente estudio representan el 55,1% (43/78) del total de infectados. Estos pueden llegar a suponer, como muestran varios estudios, entre el 50% y 60% del total de perros infectados en la zona (Abranches y col., 1991; Brandonisio y col., 1992; Solano-Gallego y col., 2001) e incluso llegar a representar el 80% de los perros infectados (Otranto y col., 2009; Queiroz y col., 2009). Y pese a que se ha señalado que en perros asintomáticos puede disminuir la sensibilidad de técnicas serológicas (Mettler y col., 2005) esto no ha sido observado ni en el presente estudio, ni en el estudio piloto tres años antes. Lo que llama la atención en este estudio es que pese a haber seleccionado aleatoriamente a los perros entre una población normal, el 41,5% de ellos presentan signos clínicos compatibles con LCan. Únicamente se observó asociación estadísticamente significativa entre onicogriposis y ser caso de LCan, ya que las asociaciones estadísticamente significativas entre hepatomegalia y esplenomegalia sólo fueron observadas en las técnicas de ELISA y DAT. Y en oculares con ELISA y el hecho de ser seropositivo conjuntamente a antígenos recombinantes y completos. Es importante resaltar que sólo el 24,1% de los perros sintomáticos de Posadas estaban infectados. Por lo que el diagnóstico basado sólo en la aparición de signos clínicos relacionados con la enfermedad podría sobrestimar la cantidad de casos infectados por *Leishmania* en esta zona. Se observa que con el incremento en el número de signos clínicos no necesariamente se aumenta la probabilidad de estar infectado. En nuestro estudio el 54,3% de los perros sintomáticos infectados presentaba de uno a tres signos clínicos.

Respecto a la incidencia acumulada en los perros que resultaron negativos a la infección por *Leishmania* al año del muestreo aleatorio simple, ésta fue del 10,5% (4,7%-16,3%), y mostró un patrón de distribución espacial homogéneo (Figura 4.3.5). Teniendo en cuenta que de los 216 perros negativos en el muestreo aleatorio simple, 32 fueron perdidos en el seguimiento, 36 no fueron incluidos porque sus dueños rechazaron continuar y 24 habían muerto en el transcurso del año, la incidencia

acumulada podría estar subestimada, ya que una proporción de estos casos podría haberse infectado por *Leishmania*.

A pesar de las limitaciones, la incidencia acumulada de infección por *Leishmania* es elevada en comparación con otros estudios en zonas endémicas de América Latina; 2,5% en la isla de Marajó, estado de Pará (Brasil) (Quinnell y col., 1997), 3,2% en la ciudad de Teresina (Brasil) (Drumond y Costa, 2011), 7% en El Brazilar, Curarigua, estado de Lara (Venezuela) (Feliciangeli y col., 2005).

Aunque las diferencias encontradas respecto a la positividad a los test realizados este mismo año y las variables como sexo, raza del perro o número de perros/casa no son estadísticamente significativas, sí que se observa una tendencia a la positividad en los perros de raza definida. La edad de la mayoría de los perros seropositivos se encuentra en el rango de 1 a 5 años, si bien es cierto que la mayoría de perros muestreados tienen entre 2 y 10 años, aunque estas diferencias tampoco fueron estadísticamente significativas. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los perros que duermen fuera de la casa y el ICT al ser realizado en plasma, aunque 4 de ellos, probablemente falsos positivos, no fueron reactivos por IFI. La presencia de signos clínicos en los nuevos casos infectados, mostró diferencias estadísticamente significativas en relación a la positividad a los test ICT en sangre, IFI y ser caso infectado por *Leishmania*.

Respecto al estudio de incidencia acumulada en 2010, se puede observar que la mayoría de casos infectados muestran algún signo clínico (76,9%) y estas diferencias observadas son estadísticamente significativas. Los signos clínicos más frecuentes fueron linfadenopatías (70,0%) y descamaciones (70,0%). Seguido de esplenomegalia (60,0%), pérdida de peso (60,0%) y hepatomegalia (50,0%) e igualmente observado por otros autores (Baneth y col., 2008; Solano-Gallego y col., 2009) (ver figura 4.2.7). Llama la atención la baja proporción de perros que muestran onicogrifosis respecto al año anterior (40,0% vs 77,1%). Esto es debido a que el desarrollo de afectación ungueal (onicogrifosis) es de aparición lenta y en cambio, los otros signos citados son característicos de la fase aguda de la enfermedad (Alvar y col., 2004; Baneth y col., 2008).

Comparando la proporción de positivos respecto a las variables estudiadas (sexo, grupo de edad, raza, donde duerme el perro, número de perros/casa y estatus clínico) en el muestreo aleatorio simple de 2009 y el muestreo de incidencia de 2010, se puede observar que las proporciones se mantienen salvo en la raza y en el estatus clínico dónde claramente se invierten (ver figura 4.2.6). También se puede observar que el número de nuevos casos entre los perros que duermen fuera de casa ha aumentado durante el transcurso de este año respecto al MAS, donde ya se

observaba que los perros que dormían fuera de casa eran más susceptibles a la infección.

Contrariamente a lo que cabría esperar, se observa que en el estudio de IA el porcentaje de perros asintomáticos positivos 3/13 (23,1%) es mucho más bajo al observado en el estudio de prevalencia (43/78, 55,1%). El estudio de IA es de corte longitudinal después de un año de exposición, y es conocido que la aparición de signos clínicos comienza en unos meses a un año de exposición (Rioux y col., 1979; Gaeta y col., 1994, Alvar y col., 2004). Debido a que se desconoce el momento de la primoinfección y la dinámica de transmisión vectorial en la zona, se desconoce si los perros se han infectado recientemente o no. Estos resultados podrían ser explicados si los vectores tuviesen uno o dos picos poblacionales y la transmisión de los parásitos fuese alrededor de la época estival, con lo cual, en el momento del presente estudio de incidencia (octubre), los perros infectados a principios de año, ya llevarían unos meses de evolución. Sin embargo, sin estudiar más a fondo evolución de la enfermedad en los canes, o la transmisión y la dinámica poblacional de los vectores no es posible por el momento dar explicación de estos datos.

ESTUDIO 3

***COMPARACIÓN DE DOS ESCENARIOS
EPIDEMIOLÓGICAMENTE DIFERENTES:
POBLACIÓN DISPERSA VS POBLACIÓN
HACINADA***

4.3. COMPARACIÓN DE DOS ESCENARIOS EPIDEMIOLOGICAMENTE DIFERENTES: POBLACIÓN DISPERSA VS POBLACIÓN HACINADA

4.3.1. OBJETIVOS

1. Comparación de los resultados de las técnicas parasitológicas directas e indirectas en dos poblaciones epidemiológicamente diferentes.
2. Determinar las diferencias y susceptibilidades de las variables estudiadas y la infección por *Leishmania* en ambos escenarios.
3. Describir en ambos contextos epidemiológicos, la distribución de los canes expuestos e infectados en relación a los signos clínicos presentados y a los resultados de las pruebas diagnósticas.
4. Explorar la variabilidad genética en los aislados de *L. infantum* de ambas poblaciones.

4.3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Escenario 1: POBLACIÓN DISPERSA/PERROS DOMÉSTICOS

Como ejemplo de población dispersa se tomaron los perros seleccionados y estudiados en el muestreo aleatorio simple de 2009 para calcular la prevalencia e incidencia de la infección por *Leishmania*, cuyo material y métodos se encuentran descritos en el estudio 2.

Escenario 2: POBLACIÓN HACINADA/PERROS ABANDONADOS

4.3.2.1. Área de estudio y selección de animales

El área de estudio se encuentra ubicada en la ciudad de Posadas, anteriormente descrita en el estudio 1 (ANEXO I.1).

Se realizó un muestreo sistemático de los 70 perros que se encontraban el día 1 de octubre de 2009 en la asociación sin ánimo de lucro “El Refugio”, ubicada en el barrio de Itaembé Miní (Posadas). Ubicación descrita en el estudio 1 y visión gráfica actual en figura 4.3.1.



Figura 4.3.1. Fotografías de la asociación sin ánimo de lucro “El Refugio” (Itaembé Mini”) (L Acosta).

Cada perro fue examinado por el veterinario/a, quienes recogieron los signos clínicos compatibles con LCan usando un protocolo estandarizado (ANEXO I.4) como se describió en el estudio 4.2.



Figura 4.3.2. Signos clínicos: **A)** Alopecia, **B)** Oculares y descamaciones, **C)** Onicogriphosis, **D)** Pérdida de peso, **E)** Apatía y pérdida de peso, **F)** Linfadenopatía (L Acosta).

4.3.2.3. Toma de muestra

El protocolo para la toma de muestra fue el mismo que el seguido en el MAS para el cálculo de la prevalencia descrito en el estudio 4.2.



Figura 4.3.3. **A)** Observación de los signos clínicos, **B)** Extracción de médula ósea, **C)** Detalle de la muestra de MO extraída (I Cruz y L Acosta).

4.3.2.4. Diagnóstico, criterios de positividad y análisis estadístico de los resultados.

La metodología usada en el presente estudio para el diagnóstico, establecimiento de los criterios de positividad y para el tratamiento de datos o el posterior análisis de los resultados, fue el mismo que los descritos en el estudio 4.2. Salvo en el estudio de variabilidad genética dónde la metodología a seguir se detalla a continuación:

Se tomó el ADN de los perros anteriormente descritos y que habían sido positivos mediante una PCR directa con el par de cebadores SAC y VAN2, que amplifican una región del ITS-1 de *Leishmania* (ITS 1-PCR) (ANEXO III. 2.2.2). A los mismos se les realizó otra PCR que amplifica una región variable de los minicírculos del ADN del kinetoplasto de *Leishmania* (kDNA-PCR) (ver ANEXO III.2.2.3). Los productos amplificados resultantes del tamaño esperado, fueron purificados a partir del gel de agarosa (ANEXO III.2.4.1). Y posteriormente digeridos con la enzima de restricción *Rsa I* (RFLP) siguiendo el protocolo descrito en el ANEXO III. 2.4.2.2.

4.3.2.5. Ética

Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de la responsable de “El Refugio” antes de la exploración clínica y extracción de las muestras (ver ANEXO I.3). El protocolo de estudio fue revisado por el comité de bioética del Ministerio de Salud de Misiones, Argentina (Expediente: 6106-135-08; Comité de Bioética, División de Zoonosis de la Subsecretaría de Atención Primaria y Salud Ambiental Salud del Ministerio de Salud de Misiones; Resolución Ministerial N°: 2332/2008).

4.3.3. RESULTADOS

Del muestreo sistemático realizado en “El Refugio” se analizaron un total de 70 perros, 37 (52,9%) eran machos y 33 (47,1%) hembras. Dada la imposibilidad de saber la edad exacta de los perros, ésta fue estimada por los veterinarios, y comprendió desde los 3 meses a más de 10 años; con una media de edad de 7,2 años. Después del examen clínico, 7 (10,0%) perros fueron clasificados como asintomáticos mientras que 63 (90,0%) presentaron uno o más de los signos clínicos relacionados con LCan.

La descripción detallada de los resultados entre las diferentes técnicas diagnósticas utilizadas en relación a las variables estudiadas; sexo, grupo de edad, raza, y el estatus clínico en “El Refugio”, se puede ver en la tabla 4.3.1 y tabla 4.3.2.

La prevalencia de la infección por *Leishmania* en el presente ejemplo de población hacinada de “El Refugio” resultó del 45,7% (33,3%- 58,1%). Un total de 32 perros de los 70 muestreados fueron identificados como infectados. La concordancia entre las técnicas parasitológicas directas e indirectas resultó del 73,1% (56,7%-89,5%). La concordancia entre las distintas pruebas diagnósticas utilizadas, se puede ver en la tabla 4.3.4.

Respecto a la positividad de las técnicas serológicas que usan como antígeno una proteína recombinante de *Leishmania* (rK39), cuando el test ICT fue realizado en plasma, se obtuvieron 34 (48,6%) perros positivos, mientras que cuando el test se realizó directamente en sangre 21 (30%) perros resultaron positivos. La concordancia entre el ICT en sangre y plasma fue del 56,6 % (38,6%-74,6%). Al analizar los plasmas por ELISA 24 (34,3%) perros resultaron seropositivos. Un total de 35 (50,0%) perros fueron positivos por rK39-ICT y/o ELISA. La concordancia entre ambas técnicas resultó del 68,6% (52,4%-84,8%).

Cuando se analizó la seropositividad por las técnicas que usan antígeno completo de *Leishmania* 28 (40,0%) perros fueron positivos por IFI en plasma y 25 (35,7%) por DAT. Un total de 29 (41,9%) resultaron seropositivos por IFI y/o DAT. La concordancia entre ambas técnicas resultó del 84,8% (72,1%-97,6%).

	Frecuencia n (%)	ICT sangre n (%)	ICT plasma n (%)	ELISA n (%)	AG Recomb n (%)	IFI n (%)	DAT n (%)	AG Completo n (%)	SEROPOS n (%)
Sexo									
Macho	37 (52,9)	10 (47,6)	18 (52,9)	11 (45,8)	19 (54,3)	13 (46,4)	13 (52,0)	14 (48,3)	13 (48,1)
Hembra	33 (47,1)	11 (52,4)	16 (47,1)	13 (54,2)	16 (45,7)	15 (53,6)	12 (48,0)	15 (51,7)	14 (51,9)
Grupo de edad									
≤ 1 año	3 (4,3)	1 (4,8)	1 (2,9)	1 (4,2)	1 (2,9)	1 (3,6)	1 (4,0)	1 (3,4)	1 (3,7)
2-5 años	18 (25,7)	6 (28,6)	7 (20,6)	6 (25,0)	7 (20,0)	6 (21,4)	6 (24,0)	6 (20,7)	6 (22,2)
6-10 años	21 (30,0)	6 (28,6)	13 (38,2)	8 (33,3)	13 (37,1)	11 (39,3)	10 (40,0)	11 (37,9)	10 (37,0)
>10 años	28 (40,0)	8 (38,1)	13 (38,2)	9 (37,5)	14 (40,0)	10 (35,7)	8 (32,0)	11 (37,9)	10 (37,0)
Raza									
Raza definida	5 (7,1)	4 (19,0)	4 (11,8)	3 (12,5)	5 (14,3)	4 (14,3)	4 (16,0)	4 (13,8)	4 (14,8)
Mestizo	65 (92,9)	17 (81,0)	30 (88,2)	21 (87,5)	30 (85,7)	24 (85,7)	21 (84,0)	25 (86,2)	23 (85,2)
Estatus clínico									
Asintomático	7 (10,0)	1 (4,8)	4 (11,8)	2 (8,3)	4 (11,4)	2 (7,1)	1 (4,0)	2 (6,9)	2 (7,4)
Sintomático	63 (90,0)	20 (95,2)	30 (88,2)	22 (91,7)	31 (88,6)	26 (92,9)	24 (96,0)	27 (93,1)	25 (92,6)
Total (%)	70 (100)	21 (100)	34 (100)	24 (100)	35 (100)	28 (100)	25 (100)	29 (100)	27 (100)

Tabla 4.3.1. Frecuencia de los perros positivos en relación a la seropositividad de las diferentes técnicas realizadas y a las variables estudiadas en el muestreo de “El Refugio”. **ICT Total:** positivo por ICT en sangre y/o plasma; **Ag recomb:** positivo por ICT y ELISA; **Ag completo:** positivo por IFI y DAT; **SERO-pos:** positivo por Ag recombinante y Ag completo.

	Frecuencia n (%)	CULTIVO n (%)	PCR n (%)	PARAPOS n (%)	Infectado n (%)
Sexo					
Macho	37 (52,9)	12 (57,1)	15 (55,6)	16 (57,1)	18 (56,3)
Hembra	33 (47,1)	9 (42,9)	12 (44,4)	12 (42,9)	14 (43,8)
Grupo de edad					
≤ 1 año	3 (4,3)	0 (0,0)	1 (3,7)	1 (3,6)	1 (3,1)
2-5 años	18 (25,7)	6 (28,6)	8 (29,6)	8 (28,6)	8 (25,0)
6-10 años	21 (30,0)	6 (28,6)	10 (37,0)	10 (35,7)	11 (34,4)
>10 años	28 (40,0)	9 (42,9)	8 (29,6)	9 (32,1)	12 (37,5)
Raza					
Raza definida	5 (7,1)	3 (14,3)	3 (11,1)	4 (14,3)	5 (15,6)
Mestizo	65 (92,9)	18 (85,7)	24 (88,9)	24 (85,7)	27 (84,4)
Estatus clínico					
Asintomático	7 (10,0)	1 (4,8)	1 (3,7)	1 (3,6)	2 (6,3)
Sintomático	63 (90,0)	20 (95,2)	26 (96,3)	27 (96,4)	30 (93,8)
Positivos/analizados (%)	70 (100)	21/60 (100)	27/69 (100)	28 (100)	32 (100)

Tabla 4.3.2. Frecuencia de los perros positivos en relación a las diferentes técnicas parasitológicas directas empleadas, los casos totales de LCan y a las variables estudiadas. **PARA-pos:** positivo por cultivo y/o PCR; **Infectado:** positivo mediante PARA-pos y/o SERO-pos.

Al analizar los perros que fueron positivos conjuntamente a antígeno total vs antígeno recombinante, finalmente se obtuvieron 27 (38,6%) perros positivos por ambas metodologías. La concordancia entre ambas resultó del 71,4% (55,3%-87,6%).

En lo referente a la positividad de las técnicas parasitológicas directas, en el 35,0% (21/60) de los cultivos se visualizaron promastigotes de *Leishmania*. Fueron descartados 10 cultivos por contaminación. Según el tipo de muestra resultaron positivos en cultivo 80,0% (4/6) muestras de GP y 32,7% (18/55) muestras de MO. Mientras que se detectó ADN de *Leishmania infantum* en el 39,1% (27/69) de los perros estudiados. Según el tipo de muestra se amplificó ADN en 77,8% (7/9) muestras de GP y 34,4% (21/61) de MO. Teniendo en cuenta a los perros positivos por ambas técnicas parasitológicas directas, en el 40,0% (28/70) de los perros se pudieron observar promastigotes en cultivo y/o ADN de *Leishmania* (ver tabla 4.3.3). La concordancia entre ambas técnicas resultó del 89,0% (76,9%-100%).

	Frecuencia n (%)	CULTIVO n (%)	PCR n (%)	PARA-pos n (%)
GP	8 (11,4)	3 (14,3)	6 (22,2)	6 (21,4)
MO	61 (87,2)	17 (80,9)	20 (74,1)	21 (75,0)
GP/MO	1 (1,4)	1 (4,7)	1 (3,7)	1 (3,6)
Total	70 (100)	21 (100)	27 (100)	28 (100)

Tabla 4.3.3. Resultados del análisis parasitológico directo en ganglio poplíteo (GP), médula ósea (MO), ganglio poplíteo y médula ósea (GP/MO). **PARA-pos:** positivo por cultivo y/o PCR.

	ICT sangre	ICT plasma	ELISA	Ag recomb	IFI	DAT	Ag Total	SERO-pos	Cultivo	PCR	PAR-pos	Infectado
ICT sangre	1											
ICT plasma	0,566	1										
ELISA	0,837	0,712	1									
Ag recomb	0,600	0,971	0,686	1								
IFI	0,72	0,77	0,878	0,743	1							
DAT	0,806	0,626	0,843	0,6	0,848	1						
Ag total	0,693	0,742	0,849	0,714	0,97	0,88	1					
SERO-pos	0,748	0,799	0,908	0,771	0,97	0,817	0,941	1				
cultivo	0,735	0,5	0,78	0,538	0,681	0,707	0,649	0,681	1			
PCR	0,683	0,59	0,783	0,564	0,728	0,692	0,7	0,757	0,89	1		
PARA-pos	0,72	0,54	0,756	0,571	0,702	0,667	0,675	0,731	0,928	0,97	1	
Infectado	0,675	0,656	0,765	0,686	0,826	0,678	0,797	0,854	0,793	0,853	0,884	1

Tabla 4.3.4. Índice Kappa de las diferentes técnicas diagnósticas empleadas en el muestreo sistemático de “El Refugio”. **ICT Total:** ICT sangre y/o plasma; **Ag recomb:** positivo por ICT y ELISA; **Ag completo:** positivo por IFI y DAT; **SERO-pos:** positivo por Ag recomb y Ag completo; **PARA-pos:** positivo por cultivo y/o PCR; **Infectado:** positivo mediante PARA-pos y/o SERO-pos.

De los 32 perros diagnosticados como caso infectado por *Leishmania*, en 23 (71,9%) de ellos las pruebas parasitológicas directas e indirectas fueron concordantes. Cuatro (12,5%) perros fueron positivos serológicamente a antígenos completos y recombinantes simultáneamente, pero las técnicas parasitológicas directas resultaron negativas. Mientras que 5 (15,6%) perros resultaron positivos únicamente por las pruebas parasitológicas directas, siendo serológicamente negativos. De los 32 perros considerados como caso infectado por *Leishmania*; 27 (84,4%) perros fueron positivos por PCR, 21 (65,6%) por cultivo, 23 (71,9%) lo fueron por DAT, 27 (84,3%) por IFI, 24 (75,0%) por ELISA, 27 (84,3%) por ICT en plasma, 21 (65,6%) por ICT en sangre.

De los 7 perros asintomáticos, 4 (57,1%) fueron positivos por antígeno recombinante y 2 (28,6%) por antígeno completo. Finalmente se observó que 2 (28,6%) de ellos resultaron seropositivos por ambas metodologías (antígeno recombinante y completo). En el 14,3% de estos perros asintomáticos se observaron promastigotes en cultivo (1/6) o se amplificó el ADN de *Leishmania* (1/7). Finalmente, dos (28,6%) perros asintomáticos fueron diagnosticados como caso Leish.

Respecto a los perros que presentaron uno o más de los signos clínicos, de los 63 perros sintomáticos, 31 (49,2%) fueron reactivos por alguna de las dos técnicas empleadas que usan antígeno recombinante, mientras que 27 (42,8%) lo fueron por alguna de las técnicas que usan antígenos completos de *Leishmania*. Resultando un total de 25 (39,7%) perros reactivos simultáneamente por ambas técnicas. En 20 (37,0%) de 54 perros sintomáticos se observaron promastigotes en cultivo y se amplificó ADN de *Leishmania* en 26 (41,9%) de 62 perros sintomáticos. Un total de 30 (93,8%) perros sintomáticos fueron diagnosticados como caso de LCan.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las siguientes variables estudiadas y las técnicas empleadas, salvo en la variable "Raza" y las técnicas que se nombran a continuación: ICT sangre, Ag recomb, DAT, SERO-pos, Caso de Leish.

Los resultados de los signos clínicos estudiados en 2009, se pueden observar en la tabla 4.3.5.

Signos clínicos	Frecuencia n (%)	Ag recomb n (%)	Ag completo n (%)	SERO-pos n (%)	PARA-pos n (%)	CASO LCan n (%)
Linfadenopatías	52 (74,3)	31 (100)	26 (96,7)	25 (100)	27 (100)	30 (100)
Onicogrifosis	43 (61,4)	24 (77,4)	22 (81,5)	20 (80,0)	23 (85,2)	24 (80,0)
Alopecia	37 (52,9)	21 (67,7)	19 (70,4)	18 (72,0)	20 (74,1)	21 (70,0)
Pérdida de peso	22 (31,4)	15 (48,4)	15 (55,5)	14 (56,0)	16 (59,3)	16 (53,3)
Hepatomegalia	22 (31,4)	17 (54,8)	16 (59,3)	16 (66,2)	15 (55,5)	17 (56,7)
Descamaciones	21 (30,0)	15 (48,4)	12 (44,4)	12 (48,0)	13 (48,1)	14 (46,7)
Esplenomegalia	21 (30,0)	16 (51,6)	15 (55,5)	15 (60,0)	14 (51,8)	16 (53,3)
Oculares	20 (28,6)	14 (45,2)	11 (40,7)	11 (44,0)	13 (48,1)	14 (46,7)
Mucosas pálidas	14 (20,0)	9 (29,0)	7 (25,9)	7 (28,0)	7 (25,9)	7 (23,3)
Úlceras	13 (18,6)	8 (25,8)	9 (33,3)	8 (32,0)	9 (33,3)	9 (30,0)
Trufa dañada	5 (7,1)	5 (16,1)	5 (18,5)	5 (20,0)	4 (14,5)	5 (17,7)
Hemorragia	4 (5,7)	3 (9,7)	2 (7,4)	2 (8,0)	2 (7,4)	2 (6,7)
Apatía	4 (5,7)	4 (12,9)	4 (14,5)	4 (16,0)	3 (11,1)	4 (13,3)
Caquexia	4 (5,7)	2 (6,5)	3 (11,1)	2 (8,0)	2 (7,4)	2 (6,7)
Total (%)	63 (100)	31 (100)	27 (100)	25 (100)	27 (100)	30 (100)

Tabla 4.3.5. Positividad de los diferentes métodos empleados respecto a los signos clínicos estudiados en el muestreo de prevalencia de 2009. **Ag recomb:** positivo por ICT y ELISA; **Ag completo:** positivo por IFI y DAT; **SERO-pos:** positivo por Ag recomb y Ag completo; **PARA-pos:** positivo por cultivo y/o PCR; **CASO LCan:** Positivo mediante PARA-pos y/o SERO-pos.

El signo clínico más prevalente fue linfadenopatía, siendo observado en 52 (82,5%) de los 63 perros sintomáticos estudiados. Siendo considerados como caso de LCan 30 (57,7%) de los perros que la presentaban.

Por otro lado, 43 (68,3%) de los perros sintomáticos presentaron onicogrifosis, 24 (55,8%) de ellos fueron diagnosticados como caso de LCan. De los 37 perros que presentaron alopecia, 21 (56,7%) fueron considerados casos de LCan. De los 22 perros en los que se había observado una pérdida de peso, 16 (72,7%) de ellos resultaron casos LCan. De los 22 perros que presentaron hepatomegalia, 17 (77,3%) fueron considerados como casos de LCan. De los 21 perros con descamaciones, 14 resultaron ser casos de LCan (66,7%). De los 21 perros que presentaron esplenomegalia, 16 (76,2%) fueron considerados casos de LCan. De los 20 perros que presentaron signos oculares, 14 (70,0%) fueron considerados como casos LCan. De los 14 perros en los que se observaron las mucosas pálidas, 7 (50,0%) de ellos fueron casos LCan. De los 13 perros que presentaron úlceras cutáneas, 9 (69,2%) de ellos fueron diagnosticados como casos de LCan. De los 5 perros que tenían la trufa dañada, 5 (100%) resultaron casos de LCan. De los 4 perros que tenían hemorragias, 2 (50,0%) resultaron ser casos de LCan. De los 4 perros con apatía, 4 (100%) fue

considerado como caso de LCan. Finalmente, de los 4 perros en los que se observó caquexia, 2 (50,0%) fue considerado caso de LCan.

Las diferencias encontradas entre la variable “Estatus clínico” y la positividad a los test diagnósticos realizados no resultaron estadísticamente significativas. Sin embargo, al analizar los signos clínicos individualmente se observó que las diferencias encontradas en los signos clínicos “Linfadenopatía”, “Hepatomegalia” y “Esplenomegalia”, respecto a todos los test diagnósticos utilizados, fueron estadísticamente significativas. Así como entre las diferencias encontradas entre “Trufa dañada” y “Apatía” con la positividad a todas las técnicas estudiadas excepto para las técnicas de diagnóstico parasitológico directo. Fueron observadas diferencias estadísticamente significativas entre la variable “Onicogriphosis” y la positividad a ICT sangre, ELISA, DAT, Ag completo, PCR, Cultivo, PARA-pos y Caso Leish. Entre la variable “Descamaciones” e ICT sangre, ICT plasma, ELISA, Ag recomb, ser SERO-pos, PCR, PARA-pos y ser Caso Leish. Entre “Alopecia” e ICT sangre, ELISA, IFI, PCR, PARA-pos y Caso Leish. Entre la variable “Pérdida de peso” e ICT sangre, ELISA, IFI, DAT, Ag completo, ser SERO-pos, PCR, Cultivo y Caso Leish. Entre “Oculares” e ICT sangre, ELISA, Ag recomb, PCR, PARA-pos y ser caso Leish. Y finalmente, entre “Úlceras” y la positividad a ICT en sangre, ELISA, IFI, DAT, Ag completo, PCR y PARA-pos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las variables “Mucosas pálidas”, Hemorragias” y “Caquexia” y la positividad a los test diagnóstico realizados.

Respecto al número de signos clínicos compatibles con LCan que se estudiaron en los perros de “El Refugio”, salvo en los que presentaron 3 ó 5 signos clínicos de los estudiados, la distribución número del número de positivos es más o menos homogénea según el número de signos clínicos. Ver resultados en la tabla 4.3.6.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la variable “Número de signos clínicos” y la positividad al ICT al ser realizado en sangre, ELISA y ser PARA-pos.

La comparación de los resultados obtenidos tras el diagnóstico parasitológico directo e indirecto respecto a la sintomatología que presentaba la población de origen, bien en el modelo epidemiológico 1 como ejemplo de población dispersa o en el modelo número 2 como ejemplo de población hacinada, se muestran en el figura 4.3.4.

Los resultados diagnósticos respecto a ambos modelos estudiados desde el punto de vista sintomatológico de los infectados se puede ver en la figura 4.3.5.

No. Sint	Frecuencia	Ag Recomb	Ag Completo	SERO-pos	PARA-pos	Caso Leish
0	7 (10,0)	4 (11,4)	2 (6,9)	2 (7,4)	1 (3,6)	2 (6,2)
1	12 (17,1)	2 (5,7)	1 (3,4)	1 (3,7)	1 (3,6)	2 (6,2)
2	7 (10,0)	1 (2,9)	1 (3,4)	1 (3,7)	2 (7,1)	2 (6,2)
3	10 (14,3)	5 (14,3)	5 (17,2)	4 (14,8)	3 (10,7)	4 (12,5)
4	7 (10,0)	4 (11,4)	3 (10,3)	2 (7,4)	2 (7,1)	2 (6,2)
5	6 (8,6)	3 (8,6)	2 (6,9)	2 (7,4)	3 (10,7)	3 (9,4)
6	4 (5,7)	2 (5,7)	2 (6,9)	2 (7,4)	3 (10,7)	3 (9,4)
7	7 (10,0)	5 (14,3)	5 (17,2)	5 (18,5)	5 (17,9)	5 (15,6)
8	4 (5,7)	3 (8,6)	2 (6,9)	2 (7,4)	3 (10,7)	3 (9,4)
9	2 (2,8)	2 (5,7)	2 (6,9)	2 (7,4)	1 (3,6)	2 (6,2)
10	1 (1,4)	1 (2,9)	1 (3,4)	1 (3,7)	1 (3,6)	1 (3,1)
11	1 (1,4)	1 (2,9)	1 (3,4)	1 (3,7)	1 (3,7)	1 (3,1)
12	2 (2,8)	2 (5,7)	2 (6,9)	2 (7,4)	2 (7,14)	2 (6,2)
Total	70 (100)	35 (100)	29 (100)	27 (100)	28 (100)	32 (100)

Tabla 4.3.6. Distribución de positivos por las distintas técnicas utilizadas respecto al número de signos clínicos que presentaban los perros de “El Refugio”. **No. Sig:** Número de signos clínicos; **Ag recomb:** positivo por ICT y/o ELISA; **Ag completo:** positivo por IFI y/o DAT; **SERO-pos:** positivo por Ag recombinante y Ag completo; **PARA-pos:** positivo por cultivo y/o PCR; **Caso Leish:** positivo mediante PARA-pos y/o SERO-pos.

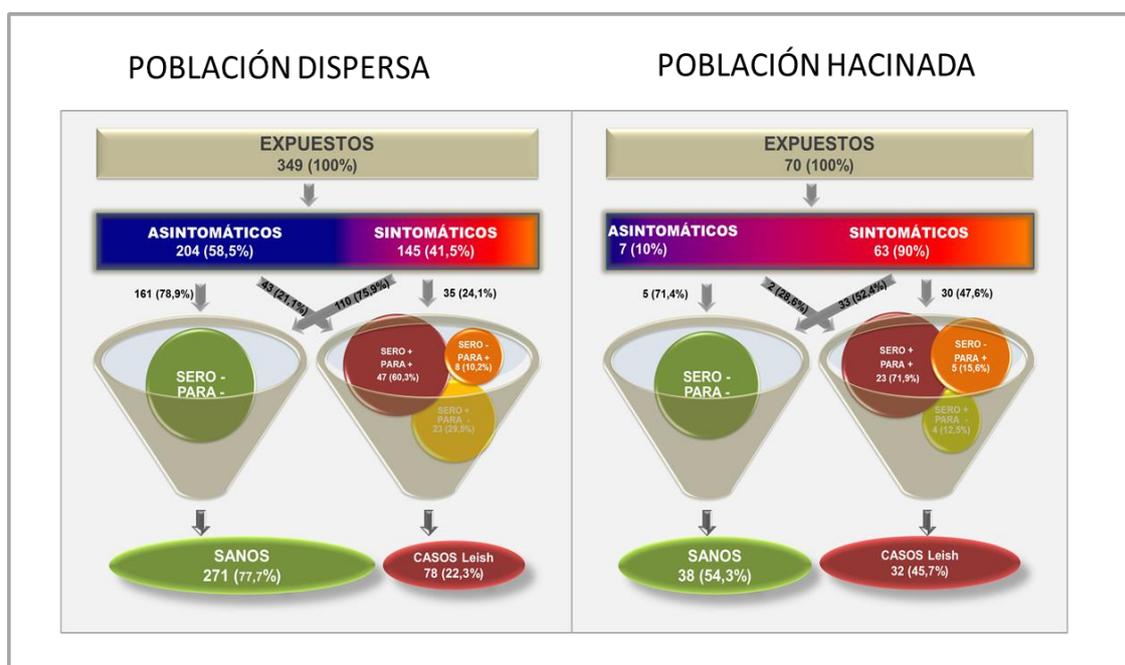


Figura 4.3.4. Distribución de la infección por *L. infantum* en población canina dispersa vs población canina hacinada, respecto a los resultados clínicos y diagnósticos. **Sero+:** positivo por las técnicas parasitológicas indirectas que usan antígeno recombinante y completo de *Leishmania*; **PARA+:** positivo por alguna de las técnicas parasitológicas directas (cultivo y/o PCR); **SERO-:** negativo por las técnicas parasitológicas indirectas que usan antígeno recombinante y completo de *Leishmania*. **PARA-:** negativo por las técnicas parasitológicas directas (cultivo y/o PCR).

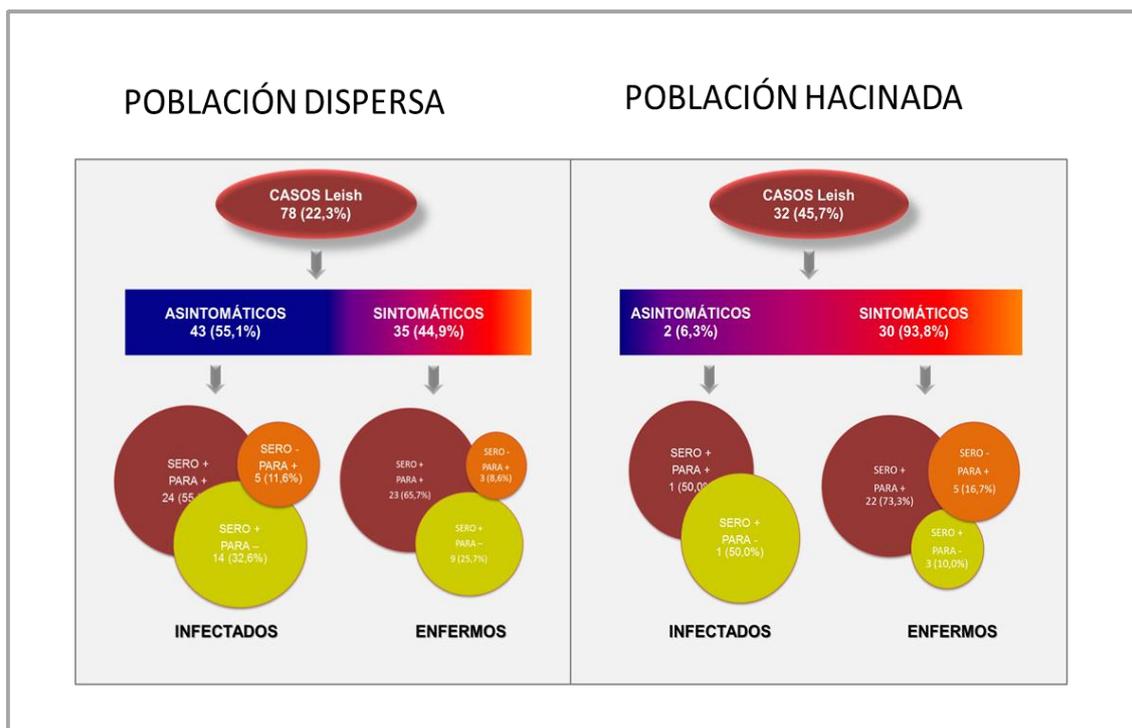


Figura 4.3.5. Resumen de resultados de las técnicas empleadas respecto al estatus clínico de los perros de población dispersa vs hacinada considerados como caso infectado por *Leishmania*. **Sero+:** positivo por las técnicas parasitológicas indirectas que usan antígeno recombinante y completo de *Leishmania*; **PARA+:** positivo por alguna de las técnicas parasitológicas directas (cultivo y/o PCR); **SERO-:** negativo por las técnicas parasitológicas indirectas que usan antígeno recombinante y completo de *Leishmania*. **PARA-:** negativo por las técnicas parasitológicas directas (cultivo y/o PCR).

Para el estudio de observación de la **heterogeneidad genética** de los aislados PCR positivos en los perros domésticos de la ciudad de Posadas (población dispersa y población hacinada), se estudiaron 53 aislados de los canes procedentes del MAS y 27 procedentes de “El Refugio”.

A estos 80 perros en los que se obtuvo amplificación de la región ITS-1, se les volvió a realizar una PCR directa de la región de los minicírculos del kDNA (kDNA-PCR) y de todos ellos, se obtuvieron productos amplificados del tamaño esperado (720 pb). Los productos de esta kDNA-PCR fueron cortados del gel, purificados y digeridos con la encima de restricción *Rsa I* y visualizados en un gel de agarosa al 2% (ver figura 4.3.6). Se pudo observar la existencia de dos patrones de restricción diferentes; uno mayoritario (A) en 69 (86,25%) de los perros y otro minoritario (B) en 11 (13,75%) de ellos. Dentro del MAS, 45 (84,9%) pertenecen al patrón A y 8 (15,1%) al patrón B. En los perros positivos de “El Refugio”, 8 (88,9%) resultaron del patrón A y 3 (11,1%) del patrón B.

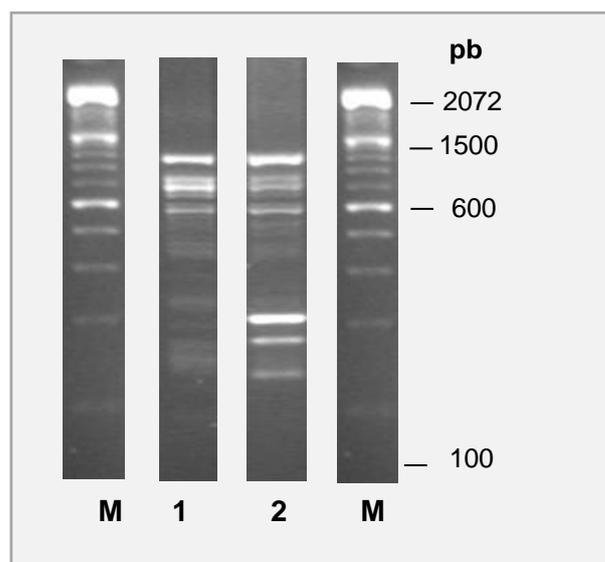


Figura 4.3.6. Resultado del patrón de restricción (RFLP) con la enzima *RsaI*. **M:** Marcador, **1:** Genotipo A (mayoritario), **2** Genotipo B (minoritario).

4.3.4. DISCUSIÓN

En lo referente a la infección por *Leishmania* en el ejemplo de población hacinada, casi la mitad de los perros (32/70) se encontraban infectados, pudiendo ser considerado como caso LCan más del 90% de ellos (30/32). La prevalencia del 45,7% es aproximadamente la misma que la encontrada en el estudio piloto tres años antes en los que la mayor parte de los perros estudiados eran abandonados (83/110) y mostraban sintomatología compatible con LCan (76/110). Llama la atención la edad de los perros en esta población hacinada, dónde el 70% (49/70) de la población estudiada y el 71,9% (23/32) de los canes infectados superan los seis años de edad.

Respecto a las técnicas diagnósticas utilizadas en el ejemplo de población hacinada, la concordancia entre las mismas es buena y los resultados no difieren mucho entre poblaciones (hacinada vs dispersa). Se puede destacar, la elevada concordancia observada entre el ICT al ser realizado en sangre y el ELISA o el DAT que supera el 80%. Cuando el ICT es realizado en plasma también se observa que las concordancias aumentan en la población hacinada respecto a la dispersa. Este aumento podría ser debido al gran número de perros sintomáticos en esta población hacinada, ya que se ha observado que este test rápido (ICT) basado en el antígeno recombinante rK39, en perros asintomáticos puede sufrir un descenso en la sensibilidad (Reithinger y col., 2002). En líneas generales el ELISA e IFI poseen

mejores concordancias al ser comparados tanto con las otras técnicas serológicas, como parasitológicas directas.

Al igual que en los dos estudios anteriores, la única especie de *Leishmania* caracterizada en los perros positivos de esta población hacinada resultó *L. infantum*. A pesar de que Misiones es una zona endémica para LC, ésta parece restringir su transmisión a la zona norte de la provincia (Fernández y col., 2012).

En lo referente a la distribución de los casos caninos según la clínica presentada por los mismos y los resultados de las pruebas diagnósticas en población hacinada vs dispersa. El 41,5% de la población dispersa presenta algún signo clínico compatible con LCan, aunque el 75,9% de los mismos no se encuentran infectados por *Leishmania*. Por otro lado, en los perros que no presentan signos clínicos compatibles con LCan, se observa que el 78,9% se encuentran realmente sanos y sólo uno de cada cinco de ellos está infectado (21,1%). Por el contrario, en el caso de los perros abandonados de “El Refugio” (población hacinada), un 90% eran sintomáticos, resultando no infectados algo más de la mitad (52,4%) (ver figura 4.3.4).

Estudiando los casos infectados por *Leishmania* en la población dispersa, se puede observar que un 55,1% de los casos, desde el punto de vista del diagnóstico clínico van a parecer sanos. Y el 44,9% pueden ser considerados realmente enfermos (LCan). Mientras que en la población hacinada el porcentaje de enfermos se eleva al 93,8% (ver figura 4.3.5). Es normal pensar que un estatus clínico no saludable va a ser una de las causas del abandono, o efecto directo del mismo.

Desde el punto de vista clínico, los perros enfermos serológicamente positivos pero con cultivo y/o PCR negativos, más los perros asintomáticos infectados, van a precisar de seguimiento por el veterinario (Solano-Gallego y col., 2011). Sin embargo, desde el punto de vista epidemiológico, todos poseen relevancia en la transmisión de la infección. Especialmente los canes asintomáticos, que van a ser muy difíciles de localizar en las labores de cribado dentro de las estrategias de control. Por lo que se hace necesaria la incorporación de herramientas experimentales y no sólo clínicas para la detección de estos canes infectados (Baneth, 2008; Maia y Campino, 2008; Miró y col., 2008).

Este estudio pone de manifiesto que una de las directrices en el control de la transmisión en esta zona, debe ser la vigilancia de estas poblaciones hacinadas, donde las propias condiciones del abandono de los perros, o el hecho de formar una mayor masa atrayente a los flebotomos, les confieren mayor susceptibilidad a sufrir LCan.

Por otro lado, en vista de las diferencias encontradas al realizar un estudio en la población de canes en condiciones de hacinamiento respecto a una población

dispersa, nos lleva a pensar que al extrapolar los resultados y conclusiones extraídos de un estudio basado en población hacinada, se pueden cometer errores y confusiones a la hora de explicar la realidad en una población.

En cuanto a la **variabilidad genética** en los aislados de los perros PCR positivos de ambas poblaciones, los datos presentados ponen en evidencia la existencia de 2 polimorfismos en la población canina infectada por *L. infantum* de Posadas. Ambos patrones han sido encontrados tanto en la población dispersa (A: 84,9% y B: 15,1%) como en la hacinada (A: 88,9 y B: 11,1) y en proporciones similares en ambas.

En Venezuela también se ha visto homogeneidad a nivel genético de aislados (perros y humanos) sin variantes intraspecíficas (Rodríguez y col., 2005). Sin embargo en Teresina (Brasil), se han observado hasta 12 genotipos distintos (Alonso y col., 2010).

El uso de la PCR-RFLP de los minicírculos del kDNA es una herramienta útil como marcador polimórfico para revelar la variabilidad tanto interespecífica (Volpini y col., 2004; de Andrade y col., 2006; Ferroglio y col., 2006; Rotureau, 2006) como intraespecífica de *Leishmania* (Angelici y col., 1989; Morales y col., 2001; Chicharro y col., 2002; Cortes y col., 2006; Cortes y col., 2010). La secuencia de los minicírculos ha sido utilizada para diversas caracterizaciones genéticas (Englund, 1981; Arnot and Barker, 1981; Laurent y col., 2007), así como para estimar la heterogeneidad dentro del género *Leishmania* (Guizani y col., 1994). La variabilidad genética dentro de los minicírculos de ADN puede suponer una mayor predisposición a tener una respuesta rápida ante las condiciones ambientales adversas y situaciones de estrés (Alonso y col., 2010). Como la segregación de los minicírculos no es totalmente conservadora durante la división celular, este marcador es más sometido a la deriva genética a corto plazo (Gao y col., 2001). En este sentido, la PCR-RFLP del kDNA es más discriminativa que otras técnicas (Botilde y col., 2006) y puede ser útil para determinar el origen de la especie (Ferroglio y col., 2006).

La escasa heterogeneidad observada en el presente estudio, podría apoyar nuestra hipótesis de una reciente introducción de la especie en la zona ya que en zonas tradicionalmente endémicas se puede observar una mayor diversidad (Cortes y col., 2010). Por lo que sería necesario profundizar en el estudio, y comparar resultados de los aislados con los de humanos, a fin de dilucidar si los mismos patrones son compartidos entre ambos.

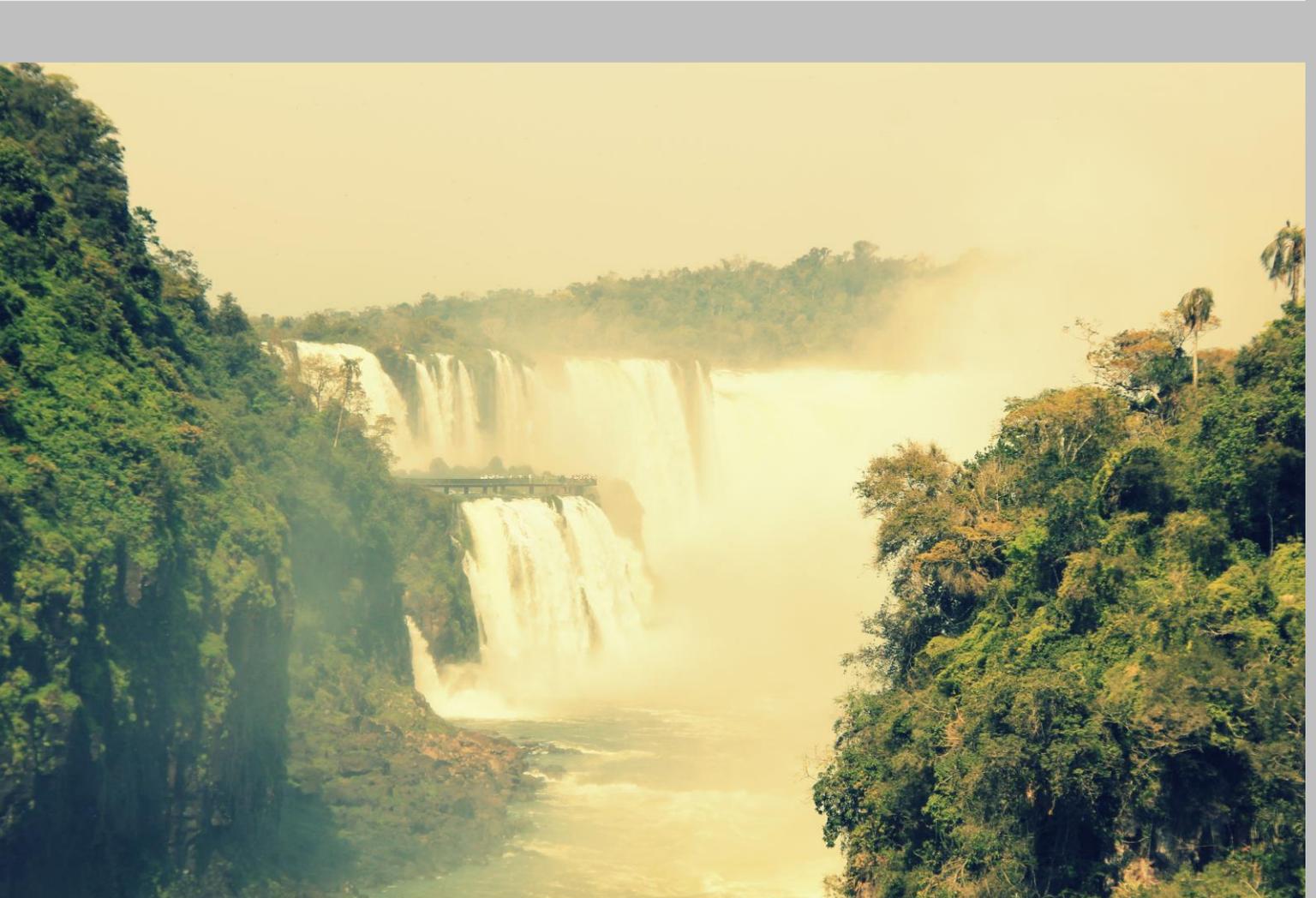
5. CONCLUSIONES



5. CONCLUSIONES

1. Se confirma en la ciudad de Posadas la presencia de leishmaniosis canina autóctona debida a la especie *L. infantum*.
2. La prevalencia de la infección por *Leishmania* en los perros domésticos de la ciudad de Posadas resultó del 22,3% (78/349).
3. Los casos infectados por *Leishmania* mostraron un patrón de distribución homogéneo en la ciudad.
4. La incidencia acumulada de la infección por *Leishmania* en los perros domésticos de la ciudad de Posadas fue del 10,5% (13/124).
5. Los resultados parasitológicos directos e indirectos en el diagnóstico de la leishmaniosis canina en la ciudad de Posadas son concordantes.
6. Los perros que duermen fuera de la casa poseen un mayor riesgo en la adquisición de la infección por *Leishmania*.
7. Los canes asintomáticos positivos representan el 55,1% (43/78) del total de los canes infectados y pueden jugar un papel importante en la transmisión natural de la infección.
8. La sintomatología relacionada con LCan en los perros domésticos es inespecífica ya que el 75,9% (110/145) de perros sintomáticos en la ciudad de Posadas no se encuentran infectados.
9. Poblaciones hacinadas poseen mayores prevalencias de la infección por *Leishmania* que en dispersas (45,7% vs 22,3%). Y no son apropiadas para estimar la prevalencia/incidencia real de la infección por *Leishmania*.
10. La heterogeneidad genética en los minicírculos del kDNA de *L. infantum* en los perros de la ciudad de Posadas mostró dos patrones diferentes, que indican una escasa variabilidad genética en la ciudad.
11. En vista de los resultados la LVZ en la ciudad de Posadas se encuentra bien establecida y podría tratarse de un foco de reciente introducción.

ANEXOS



Se adjuntan documentos principales de la metodología de trabajo:

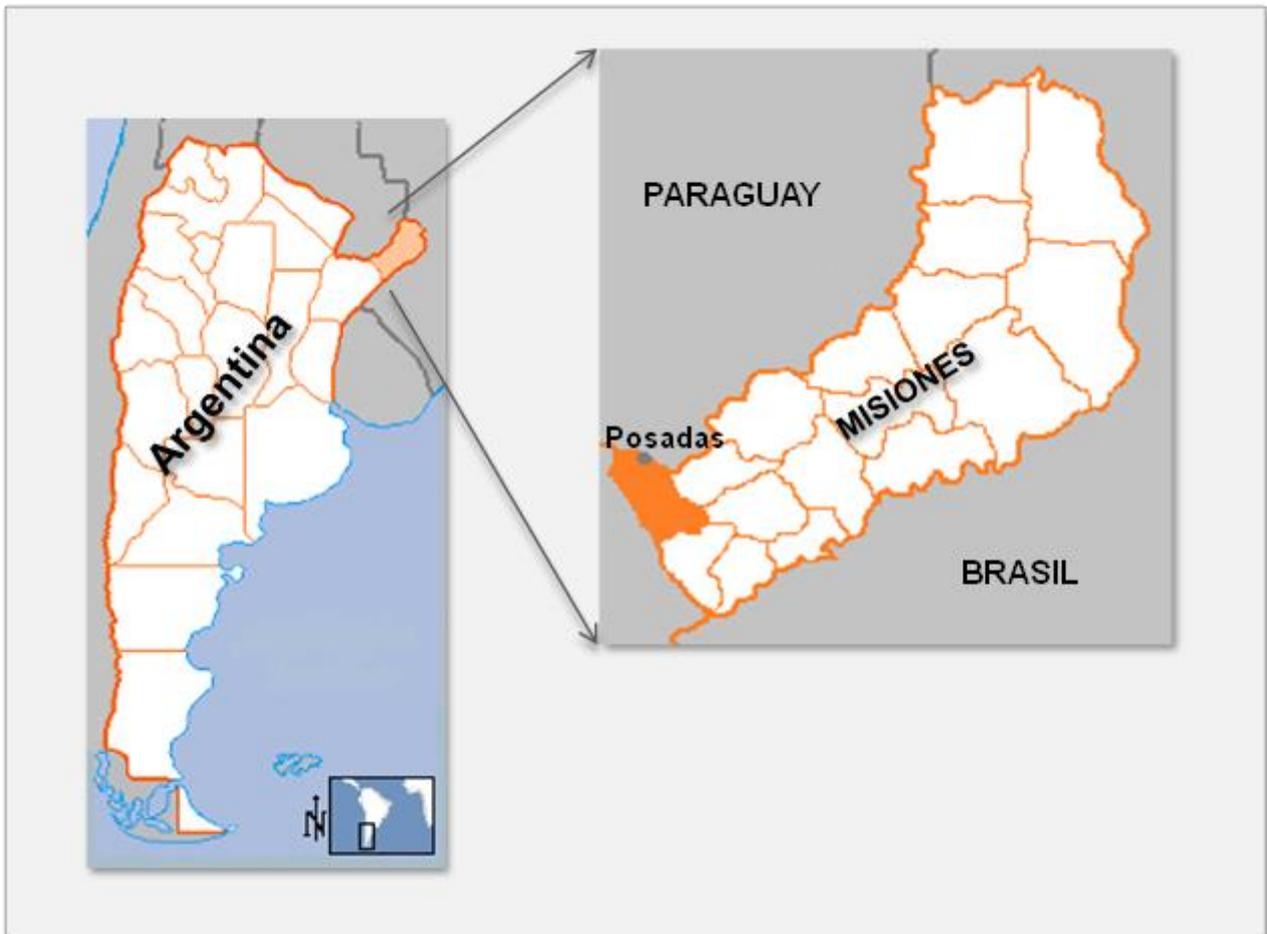
- ANEXO I. Trabajo de campo	127
I.1. Mapas del área de estudio.....	127
I.2. Instrucciones para los promotores de salud.....	128
I.3. Consentimiento informado.....	129
I.4. Hoja de trabajo.....	130
- ANEXO II. Métodos de Diagnostico Parasitológico Indirecto	131
II.1. Detección de anticuerpos anti- <i>Leishmania</i> mediante antígenos completos.....	131
II.1.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	131
II.1.2. Test de aglutinación directa (DAT).....	133
II.2. Detección de anticuerpos anti- <i>Leishmania</i> mediante antígenos recombinantes.....	138
II.2.1. Test Inmunocromatográfico rápido basado en el antígeno rK39 (rK39-ICT).....	138
II.2.2. Enzimoinmunoensayo indirecto rK39 (rK39-ELISA)	140
- ANEXO III. Métodos de Diagnóstico Parasitológico Directo	143
III.1. Aislamiento en cultivo de <i>Leishmania</i> en medio Novi- McNeal-Nicolle (NNN).....	143
III.2. Detección molecular de <i>Leishmania</i> spp.....	145
III.2.1. Extracción de ADN con fenol/cloroformo y precipitación con etanol.....	145
III.2.2. Amplificación de ácidos nucleicos mediante reacción en cadena por la polimerasa (PCR).....	146
III.2.2.1. Gen que codifica para el ARN de la subunidad pequeña del ribosoma (<i>SSU-rRNA</i>).....	146
III.2.2.2. Región del espaciador intergénico 1.....	147

III.2.2.3. Minicírculos del kinetoplasto.....	149
III.2.2.4. Materiales para PCR.....	149
III.2.3. Visualización de productos de PCR.....	150
III.2.4. Caracterización molecular.....	151
III.2.4.1. Purificación de amplificados.....	151
III.2.4.2. Análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP).....	152
III.2.4.2.1. <i>HaeIII</i>	152
III.2.4.2.1. <i>RsaI</i>	153
III.2.4.3. Secuenciación.....	153
III.2.4.4. Análisis de secuencias.....	154
- ANEXO IV. Abreviaturas.....	155
- ANEXO V. Trabajos publicados.....	159

ANEXO I. TRABAJO DE CAMPO

I.1. MAPAS DEL ÁREA DE ESTUDIO

Figura I.1. Mapas de la ubicación geográfica de la ciudad de Posadas, Misiones, Argentina.



I.2. INSTRUCCIONES PARA LOS PROMOTORES DE SALUD

Figura I.2. Instrucciones para los promotores de salud que colaboraron en el estudio 2.

INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA ANTE LA EMERGENCIA DE LA LEISHMANIOSIS VISCERAL EN LA CIUDAD DE POSADAS (ARGENTINA)

1. Ubique una dirección del listado de direcciones que se le asignó.
2. En la columna Presente del listado registre:
 - a. Si en esa dirección hay una vivienda (VIVIENDA) o un baldío (BALDÍO).
 - b. Si hay una vivienda, registre si los habitantes están presentes (PRESENTES) o ausentes (AUSENTES).
 - c. Si es un baldío o están ausentes pase a la siguiente dirección del listado de direcciones.
3. Si hay habitantes presentes explique el motivo de la visita y solicite hablar con el responsable de la vivienda.
4. Registre en la columna Perro si hay perros o no (SÍ o NO), indicando la cantidad:
 - a. Si hay perros continúe con el paso 5.
 - b. Si no hay perros, agradezca la atención y pase a la casa de la derecha. En esta casa de la derecha indique la nueva dirección. Si hay perro continúe con el paso cinco y si no hay perro pase a la siguiente dirección de la lista.
5. Ofrezca al propietario del perro participar del estudio.
6. Registre en la columna Acepta:
 - a. Si acepta participar (SÍ)
 - b. Si no acepta participar (NO)
7. Si no acepta participar, agradezca la atención y pase al siguiente número del listado.
8. Si acepta participar del estudio, lea el consentimiento al propietario y rellene los espacios en blanco en el consentimiento.
9. Pregunte si hay dudas sobre lo que comentó y respóndalas.
10. Haga que el propietario firme el consentimiento.
11. Anote un teléfono de contacto del propietario del perro (teléfono fijo y celular, en lo posible).
12. Informe que en una próxima visita durante Octubre 2009 el veterinario realizará el examen clínico y la toma de las muestras al perro.
13. Agradezca la atención.
14. Al finalizar de recorrer todos los domicilios entregue el listado y los consentimientos firmados por los propietarios en Atención Primaria de la Salud, Ministerio de Salud Pública.

I.3. CONSENTIMIENTO INFORMADO

Figura I.3. Modelo de consentimiento informado utilizado en el estudio 2.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

En la ciudad de Posadas, a los días del mes dede dos mil nueve, por el presente documento perteneciente al proyecto “Investigación epidemiológica ante la emergencia de la Leishmaniosis Visceral en la ciudad de Posadas (Argentina)” el que suscribe

.....
 DNI:..... hace constar que presta su consentimiento en pleno conocimiento de sus actos, a partir de este momento, en el proyecto mencionado. Expresando también conformidad y autorización en su carácter de propietario responsable para que a su perro/a: se le realicen los estudios que se especifican en el protocolo de dicho proyecto.

Por otra parte se deja constancia de que la participación es voluntaria y que se acuerda expresamente que toda información personal o del perro que el equipo obtenga con motivo de la investigación, así como el hecho en sí de su participación en ella serán estrictamente confidenciales.

La participación del perro implica la recolección de una muestra de sangre, y una de médula ósea o ganglio poplíteo para estudios de diagnóstico específico de Leishmaniosis Visceral. Las autoridades del proyecto se comprometen a presentar al propietario los resultados de laboratorio de su perro, así como a informar la detección de alguna patología durante el examen clínico del perro.

Por lo precedentemente expuesto y enterada/o debidamente del contenido del presente trabajo y comprendiendo toda la información precedente ratifica su participación en el proyecto y firma este documento:

 Firma y aclaración.

I.4. HOJA DE TRABAJO

Figura I.4. Hoja de trabajo utilizada en los estudios experimentales 1, 2 y 3.

		Posadas, __ de Octubre de ----	
PROPIETARIO			
Nombre: _____		Teléfono: _____	
Dirección: _____		Localidad: _____	
ANIMAL			
Nombre: _____		Edad: _____	Código: _____
Raza: _____		Peso: _____	Sexo: _____
Nº perros en el domicilio <input type="checkbox"/>		Hábitat en la vivienda: _____	
Serología rK39-ICT :			
POSITIVO <input type="checkbox"/>		NEGATIVO <input type="checkbox"/>	
Antecedentes: _____			
ALOPECIAS		ANOREXIA	
DESCAMACIONES EPITELIALES		SINTOMAS OCULARES	
TRUFA SECA		APATIA	
ULCERACIONES		ADELGAZAMIENTO	
ONICOGRIFOSIS		ENTERITIS	
LINFADENOPATIAS		FIEBRE	
HEPATOMEGALIA		MUCOSAS ALTERADAS	
ESPLENOMEGALIA		HEMORRAGIAS	
Otros: _____			
Muestras:			
Sangre <input type="checkbox"/>	MO <input type="checkbox"/>	Suero <input type="checkbox"/>	Otras <input type="checkbox"/>

ANEXO II. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO INDIRECTO

II.1. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-*Leishmania* MEDIANTE ANTÍGENOS COMPLETOS

II.1.1. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Fundamento del test

Se trata de una técnica microscópica cuya base es una reacción inmunológica con un marcador fluorescente para valorar la presencia de anticuerpos. La técnica consiste en incubar el antígeno que se encuentra fijado a un portaobjetos con la muestra a valorar. Posteriormente se le añade un anti-anticuerpo marcado con el fluoróforo que se unirá al complejo formado y se visualiza la positividad o no del ensayo en un microscopio con lámpara de luz ultravioleta. El protocolo utilizado para la detección de anticuerpos anti-*Leishmania* está basado en el descrito por Bray (1985).

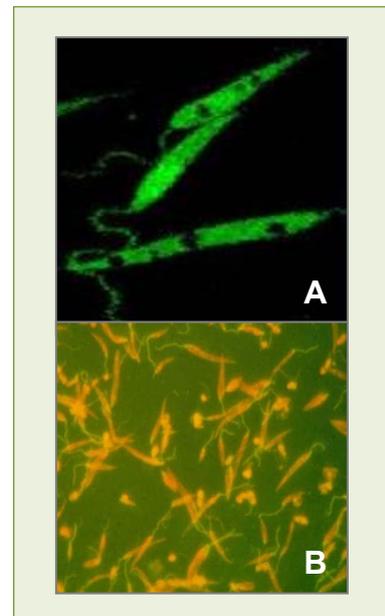
Procedimiento

- 1.- Los promastigotes en fase estacionaria (cepa MHOM/FR/78/LEM-75 de *Leishmania infantum*) se lavan tres veces en PBS 0,01 M a pH 7,2, y 10 µl de una suspensión de 2×10^7 parásitos/ml se dispensan en un portaobjetos de inmunofluorescencia de 15 pocillos.
- 2.- Secar al aire durante 1 h a 37°C.
- 3.- Seguidamente los portaobjetos se fijan con acetona fría (-20°C) durante 5 min.
- 4.- Después de dos lavados en agua destilada, los portaobjetos se dejan secar al aire.
- 5.- Los sueros/plasmas se diluyen convenientemente en PBS al duplo desde la dilución 1/40 (2 µl de suero en 80 µl de PBS) hasta la dilución 1/20.480.
- 6.- Se depositan 10 µl de cada dilución en cada uno de los pocillos y se incuban durante 30 min a 37°C en una cámara húmeda.
- 7.- Después de dos lavados en PBS, de 10 min cada uno, y uno con agua destilada, los portaobjetos se secan al aire.
- 8.- Se ponen 10 µl del conjugado marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) diluido convenientemente según las instrucciones del fabricante (FITC-conjugated rabbit anti-dog IgG (H+L), ICN Laboratories. Plaza, Costa Mesa, California) en 0,01% de Azul de Evans.
- 9.- Los portaobjetos se incuban durante 30 min a 37°C en una cámara húmeda y en oscuridad.

- 10.- Después de tres lavados con PBS, 10 min cada vez, en agitación y oscuridad, se lava una vez en agua destilada y los portaobjetos se dejan secar al aire y en oscuridad.
- 11.- Los portaobjetos se montan con glicerol-PBS pH 9,2 (9:1) y un cubreobjetos.
- 12.- Finalmente, los portaobjetos se leen en un microscopio de fluorescencia (Dialux 20EB, Leitz, Alemania) con el objetivo de 40X. Se considera el título de anticuerpos de la muestra, la última dilución en que la misma es reactiva.

Interpretación de los resultados

Figura II.1. A) Positivo: Los promastigotes se observarán en color verde fluorescente (1000X). **B) Negativo:** Los promastigotes se observan en color rojo (400X).



II.1.2. TEST DE AGLUTINACIÓN DIRECTA (DAT)

(ITM-DAT/VL, Prince Leopold Institute of Tropical Medicine. Applied Technology & Production unit, Antwerpen, Belgie)

Fundamento del test:

Con la técnica de aglutinación directa, los anticuerpos pueden ser detectados en la sangre o el suero/plasma de los pacientes incluso antes de la aparición de los primeros síntomas clínicos. El test es llevado a cabo en una micro placa multipocillo con fondo en V, con la mezcla de 50 µl de antígeno y 50 µl de sangre (en papel de filtro) o suero.

Procedimiento (según instrucciones del fabricante):

Reconstitución del antígeno

- Usando una jeringuilla de 2,5 ml, añadir 2,5 ml del **DAT-BUFFER** al vial con el antígeno DAT liofilizado.
- Inmediatamente mezclar suavemente el vial unos segundos hasta la obtener una mezcla homogénea.
- El antígeno está listo para usar.

Nota: 1. Antes de cada uso mezclar el vial suavemente unos segundos.
2. Guardar el antígeno protegido del sol y el polvo.

Reconstitución de los controles

- Usando una jeringuilla de 2,5 ml, añadir 0,5 ml del **DAT-BUFFER** al vial del control positivo y negativo respectivamente.

Preparación del DAT-DILUENT + 2-MERCAPTOETANOL (2-ME)

- Usando una jeringuilla de 1,8 ml, añadir 0,24 ml de 2-ME al vial (30 ml) del **DAT-DILUENT**
- Use esta solución para preparar las diluciones de las muestras.

Cribado de las muestras de suero (Diluciones 1:200 a 1:3.200):

- Preparar las diluciones acorde con el ejemplo

- Nota: Reservar los pocillos de la columna 1 para el control positivo y el de la columna 2 para el control negativo. En este caso no poner nada en los pocillos 1C y 2C. Cuando se preparen muchas muestras, se deben incluir controles en cada placa.

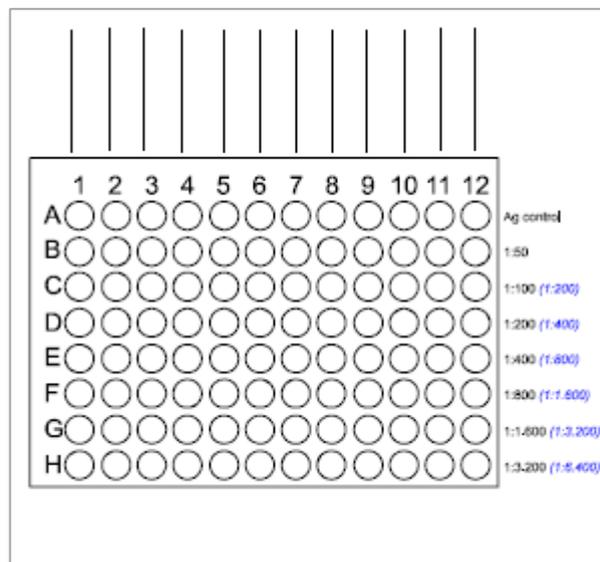


Figura II.2. Ejemplo de la placa a realizar.

- Añadir 50 µl del **DAT-DILUENT** (con 2-ME) en cada uno de los pocillos de las filas A, -, C, D, E, F, G, y H, pero no en el B.
- Dispensar 100 µl del **DAT- DILUENT** en los pocillos de la fila B, excepto en el 1B y 2B.
- Controles: Dispensar 100 µl del “control positivo” en el pocillo 1B y 100 µl del “control negativo” en el pocillo 2B.
- Añadir 1 µl de muestra problema en cada pocillo de la fila 3B a 12B.
- Diluciones de las muestras: Usando una pipeta multicanal, transferir 50 µl desde la fila B a la C, mezclar 3 veces y transferir 50 µl a la fila D, mezclar 3 veces y continuar hasta la fila H. Descartar 50 µl de los pocillos de la fila H.
- Antígeno: Mezclar el vial y resuspender el **DAT-antigen**. Usando una pipeta multicanal añadir 50 µl del **DAT-antigen** a cada pocillo excepto en la columna B. Sin tocar el líquido de los pocillos.
- Sellar la placa con el adhesivo suministrado.
- Agitar suavemente la placa apoyada en la mesa con movimientos circulares. Evitando que el líquido de los pocillos toque con la parte inferior del adhesivo.
- Incubar toda la noche a temperatura ambiente en posición horizontal y no mover las placas.
- Leer los resultados.

Titulación a gran escala (1:200 a 1:204.800):

- Preparar la placa como sigue a continuación

Nota: En los pocillos que contengan el control, fila A para el control positivo y fila B para el control negativo. No llenar los pocillos A2 ni B2. Cuando se preparen varias placas se deben incluir ambos controles en cada una de ellas.

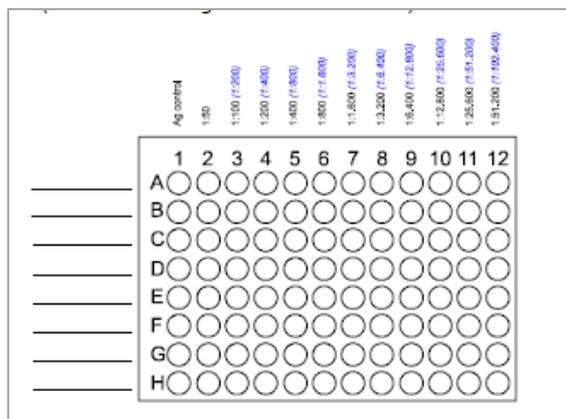


Figura II.3. Ejemplo de la placa a realizar.

- Dispense 50 µl del **DAT-DILUENT** (con 2-ME) en cada uno de los pocillos de las columnas verticales 1, 3, hasta la 12, pero no en la 2.
- Dispensar 100 µl del **DAT-DILUENT** en los pocillos de la columna 2.
- Controles: Dispensar 100 µl del “control positivo” en el pocillo A2 y 100 µl del “control negativo” en el pocillo B2.
- Añadir 1 µl de muestra problema en cada pocillo de la columna desde 2C a 2H.
- Diluciones de las muestras: Usando una pipeta multicanal, transferir 50 µl desde la columna 2 a la 3, mezclar 3 veces y transferir 50 µl a la columna 4, mezclar 3 veces y continuar hasta la columna 12. Descartar 50 µl de los pocillos de la columna 12.
- Antígeno: Mezclar el vial y resuspender el **DAT-antigen**. Usando una pipeta multicanal añadir 50 µl del **DAT-antigen** a cada pocillo excepto en la columna 2. Sin tocar el líquido de los pocillos.
- Sellar la placa con el adhesivo suministrado.
- Agitar suavemente la placa apoyada en la mesa con movimientos circulares. Evitando que el líquido de los pocillos toque con la parte inferior del adhesivo.

- Incubar toda la noche a temperatura ambiente en posición horizontal y no mover las placas.
- leer los resultados.

Interpretación de los resultados:

El DAT se debe leer colocando un fondo blanco bajo la placa. Dos observadores diferentes deben de leer el test. En presencia de anticuerpos anti-*Leishmania*, el antígeno DAT se aglutina y forma una capa azul pálido en el pocillo. Por el contrario en ausencia de anticuerpos las células se depositan en el fondo del pocillo como un pequeño botón azul oscuro.

Nota: Una diferencia de una dilución en la titulación final de entre dos titulaciones de la misma muestra es inherente al test.

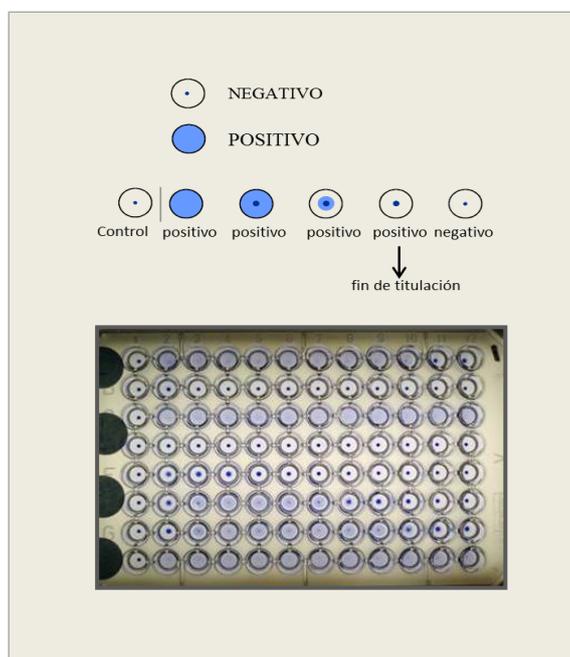


Figura II.4. Ejemplo de placa resultante con diferentes sueros caninos.

Reactivos:

ANTIGENO-DAT (2,5 ml/vial)

- Liofilizado de una suspensión de promastigotes de *L. donovani* cepa 1-S, tratados con tripsina, purificados y fijados.
- Conservante: Ácido sódico (0,1 %)
- Conservación: Refrigerado (+2°C / +8°C) o congelado (-20°C)

DAT-BUFFER / DAT-DILUENT (30 ml/vial)

- Reactivo salino con fosfato (PBS – pH 7,2) suplementado con proteína.
- Usar para la reconstitución del DAT-antigen, controles positivo y negativo y para elución de la sangre en papel de filtro.
- Conservante: Acida sódica (0,1%)
- Conservación: Refrigerado (+2°C / +8°C). NO CONGELAR

CONTROL POSITIVO (0,5 ml/vial)

- Liofilizado de suero diluido en PBS
- Conservante: Acida sódica (0,1 %)
- Conservación: Refrigerado (+2°C / +8°C) o congelado (-20°C)

CONTROL NEGATIVO (0.5 ml/vial)

- Liofilizado de suero diluido en PBS
- Conservante: Acida sódica (0,1 %)
- Conservación: Refrigerado (+2°C / +8°C) o congelado (-20°C)

2-MERCAPTO-ETANOL (0.5 ml/vial) TÓXICO

- 2-ME Comercial (Merck)
- Conservación: refrigerado (+2°C / + 8°C)

II.2. DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-*Leishmania* MEDIANTE ANTÍGENOS RECOMBINANTES

II.2.1. TEST INMUNOCROMATOGRÁFICO RÁPIDO BASADO EN EL ANTÍGENO rK39 (rK39- ICT)

(Kalazar Detect™ Rapid test, InBIOS International, Seattle, WA)

Fundamento del test:

El test rK39-ICT utiliza una proteína recombinante específica del complejo *L. donovani/infantum*, sin presentar reactividad cruzada con otras especies de *Leishmania*.

Está indicado para su utilización en diagnóstico presuntivo y estudios epidemiológicos. Puede utilizarse en los servicios de salud de cualquier nivel, tanto en el cribado de primera línea en las comunidades rurales en riesgo como en laboratorios de referencia local. Además, su simplicidad lo hace muy útil para el diagnóstico en el terreno.

Esta técnica puede realizarse utilizando como muestra biológica el suero, plasma o sangre del paciente.

Procedimiento (según instrucciones del fabricante):

- 1- Sacar la tira del envase.
- 2- Añadir en un tubo tipo eppendorf 3 gotas del tampón suministrado con el kit.
- 3- Aplicar 15 µl de la muestra problema (sangre o suero) en la zona indicada de la tira.

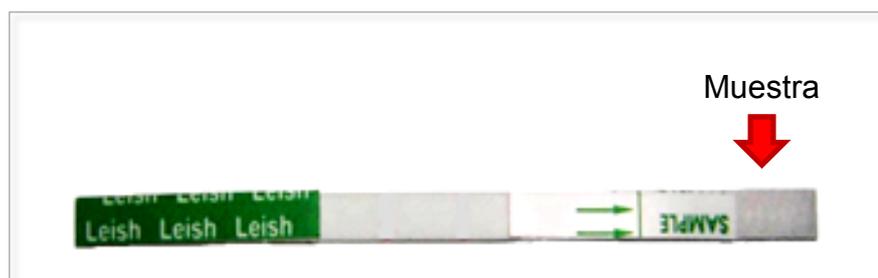


Figura II.5. Ejemplo de ICT.

- 4- Introducir la tira en el tubo preparado anteriormente. Esperar 5-10 minutos y leer el resultado.

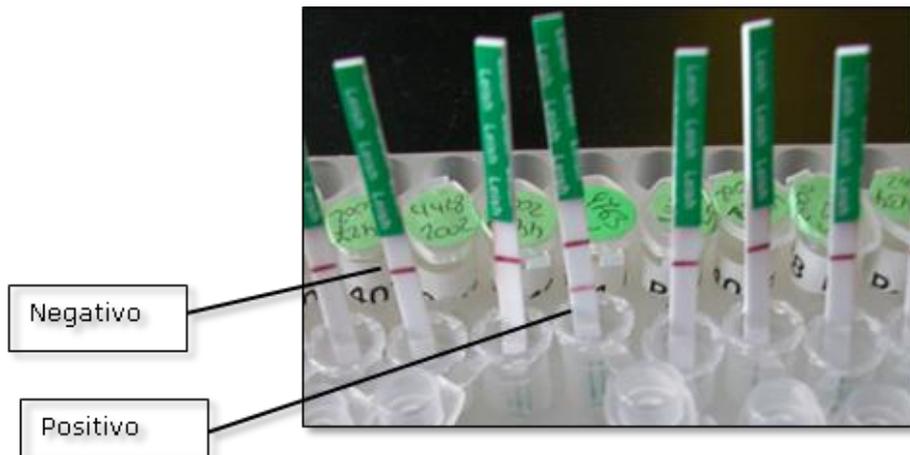


Figura II.6. Resultados del rK39-ICT.

Interpretación de los resultados:

Positivo: Deben aparecer dos líneas: control y prueba. La muestra analizada presenta anticuerpos que reconocen el antígeno recombinante de rK39 de *Leishmania*. Incluso una línea tenue debe considerarse positiva.



Figura II.7. rK39-ICT positivo.

Negativo: Aparece sólo la línea de control. No hay anticuerpos contra el antígeno recombinante K39 de *Leishmania* en la muestra del paciente.



Figura II.8. rK39-ICT negativo.

Resultado no válido: No aparece la línea de control. En esta situación, es recomendable probar una nueva muestra del paciente fresca con otra tira.



Figura II.9. rK39-ICT no válido.

II.2.2. ENZIMOINMUNOENSAYO INDIRECTO rK39 (rK39-ELISA)

Fundamento:

Se basa en la fijación del antígeno (rK39) a un sustrato sólido con posterior lavado para eliminar los antígenos no fijados o deficientemente fijados. Se añade el suero con los anticuerpos a evaluar de tal forma que reaccionarán específicamente con los antígenos fijados previamente. Se procederá a un lavado para eliminar los anticuerpos que no se hayan unido. Se añadirá un anti-anticuerpo conjugado con un enzima que se unirán a los anticuerpos que anteriormente se hayan unido a los antígenos fijados en la placa. Se realiza un último lavado para eliminar el conjugado que no haya reaccionado. Por último se añade un sustrato para la enzima marcadora. Se bloquea la reacción de la enzima y se observa la densidad óptica (colorimetría) del producto final obtenido.

Procedimiento:

1. Sensibilizar las placas con 50 ng del antígeno recombinante rK39 diluido en 50 μ l de "coating buffer" (15 mM Na_2CO_3 , 28 mM NaHCO_3 , pH= 9,6): rK39) por pocillo. Incubar las placas toda la noche a 4 $^\circ\text{C}$.
2. Bloquear las placas (Falcon Probind #3915, con PBS (pH= 7,4) con Tween 20 al 1% para rK39). Incubar a temperatura ambiente durante 60 min (200 μ l por pocillo).
3. Lavar 3 veces con PBS - Tween-20 al 0,1%, durante 5 min.
4. Añadir los sueros previamente diluidos al 1/100 en PBS con Tween-20 al 0,1%. Incubar 30 min a temperatura ambiente (50 μ l por pocillo).
5. Lavar 3 veces con PBS con Tween-20 al 0,1%, durante 5 min.
6. Añadir el conjugado (Dog IgG, IgG1, IgG2, antibody HRP conjugated, Bethyl Laboratories, INC, TX 77356) diluido convenientemente (anti IgG total 1/2.000, anti IgG1 1/800 y anti IgG2 1/2.000). Incubar a temperatura ambiente durante 30 min (50 μ l por pocillo).
7. Lavar 3 veces con PBS - Tween-20 al 0,1%, durante 5 min.
8. Añadir 100 μ l por pocillo del sustrato. Para preparar el sustrato diluir una cápsula de tampón citrato sódico con perborato (Sigma) en 100 ml de H_2O destilada. Diluir una tableta de ABTS (2,2'-Acino-bis (3-etillbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) diammonium salt 10 mg/tableta, Sigma) en 20 ml de Tampón citrato. Incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min.
9. Añadir 100 μ l de SDS al 5% para frenar la reacción.

10. Leer la densidad óptica (DO) a a 405 nm con un espectrofotómetro para placas de ELISA (Merck ELISA System MIOS, Merck).

Interpretación de los resultados:

Debido a la heterogeneidad y variabilidad entre experimentos intrínsecas a esta técnica colorimétrica tanto por su naturaleza de reacción enzimática como por el momento de bloqueo de la reacción, una vez medida la densidad óptica, es necesario calcular el punto de corte que determinará la positividad. Para este cálculo se consideraron los resultados de DO de 25 sueros de la población de estudio (sueros de los perros de Posadas) que habían resultado negativos por todas las técnicas realizadas, se hizo la media de las DO y se le sumó 3 veces la desviación estándar. Todos los perros con DO resultantes por encima de este valor resultante fueron considerados como seropositivos por esta técnica, mientras que los valores inferiores se consideraron negativos. En el presente estudio el punto de corte para la seropositividad resultó ser el valor 0,13.

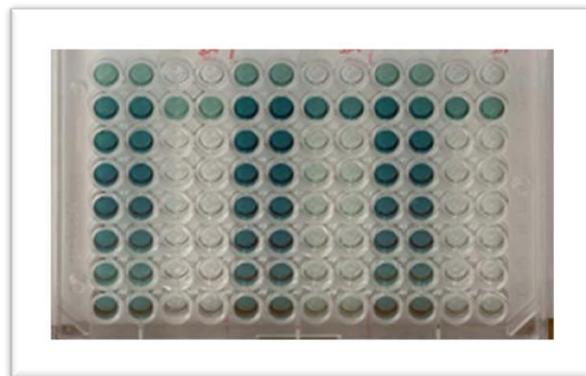


Figura II.10. Ejemplo de un resultado de ELISA.

ANEXO III. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DIRECTO

III.1. AISLAMIENTO EN CULTIVO DE *Leishmania* EN MEDIO NOVIMcNEAL-NICOLLE (NNN)

Si se trata de un fluido, la muestra biológica se siembra directamente en medio de cultivo NNN y en el caso de las biopsias se procede a una maceración previa.

La preparación detallada del medio NNN modificado se describe a continuación:

- 1- Mezclar 3 g de NaCl (Cloruro sódico) con 500 ml agua destilada estéril mediante agitación magnética.
- 2- Añadir 6 g de Bacto-ágar (Difco), someter a ebullición y agitación durante 5 minutos.
- 3- Esterilizar en autoclave a 120° C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos. Preservar a 4 °C.
- 4- Cuando se vaya a necesitar, fundir el ágar y dejar enfriar hasta 50° C.
- 5- Preparar tubos para cultivo con tapón de rosca y añadir a cada uno 2 ml del ágar fundido, 1 ml de sangre de conejo defibrinada con perlas de cristal y penicilina 100 UI/ml (20.000 UI/ml, PEN-STREP, Cambrex), más estreptomycinina 100 µg/ml (20.000 µg/ml, PEN-STREP, Cambrex).
- 6- Colocar los tubos inclinados hasta que el ágar solidifique (formando pico de flauta) en tubos estériles de 10 ml de capacidad (Cellstar, Greiner Bio-one). Incubar uno de los tubos a 37° C durante 24 horas y examinar para comprobar la esterilidad del lote. En este momento los tubos pueden conservarse a 4° C hasta 15 días.

Inoculación:

En el momento de proceder al cultivo, añadir al medio NNN 100 µl de RPMI 1640 (Gibco), suplementado con 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycinina, 2 mM de L-Glutamina y 10% de suero fetal bovino (CFS; Biological Industries, Israel) inactivado por calor.

Posteriormente, se añaden 100 µl de muestra problema, que en el presente estudio fue médula ósea o linfa del ganglio poplíteo. Tras sembrar el inóculo, el cultivo se mantiene a 27° C durante 7 días.

Visualización del cultivo:

A la semana de la inoculación de la muestra en medio NNN, se toma una gota de sobrenadante para realizar la observación en fresco de los promastigotes móviles con objetivo de 40 aumentos. Si el resultado es negativo, se llevan a cabo pases consecutivos con medio NNN cada semana (los pases se realizan pasando la fase líquida a un tubo nuevo con medio NNN fresco), y si después de cuatro pases consecutivos no se observan promastigotes, el cultivo se considera negativo.



Figura III.1. A) Tubo con medio NNN en pico de flauta, **B)** Promastigotes libres en cultivo al microscopio óptico (400X) (www.who.int).

III.2. DETECCIÓN MOLECULAR DE *Leishmania* spp.

II.2.1. EXTRACCIÓN DE ADN CON FENOL/CLOROFORMO Y PRECIPITACIÓN CON ETANOL

El protocolo se llevó a cabo según Maizels y col., 1991, con pequeñas modificaciones.

Procedimiento:

1. En un tubo de 1,5 ml añadir 100 µl de muestra biológica o hasta 20 mg tejido
2. Añadir 400 µl de NET10 (10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl), 40 µl de SDS 10% y 4 µL proteinasa K (20 mg/ml)
3. Incubar a 56° C toda la noche en agitación
4. Añadir 500 µl fenol equilibrado/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), mezclar por inversión 10 veces
5. Centrifugar 6 min 13.000 rpm
6. Recuperar la fase acuosa sobre un tubo nuevo que contenga 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1)
7. Centrifugar este último tubo 6 min 13.000 rpm
8. Recuperar la fase acuosa sobre un tubo que contenga 700 µl de etanol absoluto y añadir 30 µl de acetato sódico 3 M, y mezclar por inversión 10 veces
9. Guardar 20 min a -70°C (alternativamente toda la noche a -20°C)
10. Centrifugar 6 min 13.000 rpm
11. Decantar el sobrenadante
12. Añadir 1000 µl etanol 70%, mezclar por inversión 10 veces
13. Centrifugar 6 min 13.000 rpm
14. Decantar sobrenadante
15. Secar al aire
16. Resuspender en 100 µl de H₂O bd estéril.

III.2.2. AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA POR LA POLIMERASA (PCR)

Se han utilizado varias técnicas de PCR para la amplificación de diferentes regiones del genoma de *Leishmania*.

III.2.2.1. GEN QUE CODIFICA PARA EL ARN DE LA SUBUNIDAD PEQUEÑA DEL RIBOSOMA (*SSU-rRNA*).

Se trata de una PCR anidada (LnPCR) que amplifica la región variable del gen que codifica el ARN de la subunidad pequeña del ribosoma (*SSU-rRNA*) de *Leishmania*. Dicha región presenta un bloque de secuencia que es conservado para todo el género *Leishmania*, al mismo tiempo que presenta diferencias con otros organismos (Meredith y col., 1993; Simpson y col., 2002). De este modo, la LnPCR permite amplificar todas las especies de *Leishmania* de manera específica.

Los cebadores de la primera reacción de PCR fueron R221 específico para los protozoos kinetoplásticos y R332 específico para el género *Leishmania* y *Crithidia* (diseñados por van Eys y col. (1992). Para la segunda reacción se emplearon los cebadores R223 y R333 ambos específicos para el género *Leishmania*. Los productos de amplificación obtenidos presentaron 603 pb y de 353 pb, respectivamente (Cruz y col, 2002b). Los componentes y los programas para la realización de la LnPCR se detallan en las tablas III.1 y III.2.

	Composición	Primera reacción	Segunda reacción
Tampón de reacción 10X	75 mM Tris HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 20 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , MgCl ₂ 20 mM	5 µl	2,5 µl
dNTPs 10mM	dATP, dTTP, dGTP, dCTP	200 µM	200 µM
Cebador R221	5´- GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG - 3´	0,3 µM	-
Cebador R332	5´- GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG - 3´	0,3 µM	-
Cebador R223	5´- TCC CAT CGC AAC CTC GGT T - 3´	-	0,3 µM
Cebador R333	5´- AAA GCG GGC GCG GTG CTG - 3	-	0,3 µM
Tth ADN polimerasa 1U/µl		0,028 U	0,028 U
ADN		10µl	10µl*
Agua destilada estéril		Hasta 50 µl	Hasta 25µl

Tabla III.1. Componentes para las reacciones de PCR.* 10 µl de la dilución de 25 µl del primer producto de PCR en 1ml de agua destilada y estéril.

	Hot start		Ciclos 30X			Extensión final
			Desnatu- ralización	Alinea- miento	Extensión	
Primera reacción	80°C 2min	94°C 5min	94°C 30seg	60°C 30seg	72°C 30seg	72°C 5min
Segunda reacción	80°C 2min	94°C 5min	94°C 30seg	65°C 30seg	72°C 30seg	72°C 5min

Tabla III.2. Programa de amplificación para la LnPCR.

III.2.2.2. REGIÓN DEL ESPACIADOR INTERGÉNICO-1 (ITS-1)

Se trata de una PCR anidada (nPCR) que amplifica una región del del espaciador transcrito interno-1 (ITS-1) perteneciente al operón ribosomal de *Leishmania*. La primera reacción está basada en los cebadores LITSR y L5.8S diseñados por Schönian G y col., 2003 y para la segunda reacción se usaron los cebadores SAC y VAN2, diseñados por I. Cruz del Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de salud Carlos III, Madrid, España. Se observa una banda de 300-350 pb (dependiendo de la especie de *Leishmania*) para la primera reacción y otra de 280-330 pb (dependiendo de la especie de *Leishmania*) para la segunda reacción.

Los cebadores utilizados para la amplificación y las condiciones de trabajo se encuentran descritos en las tablas III.3 y III.4.

Composición	Primera reacción	Segunda reacción	
Tampón de reacción 10X	75 mM Tris HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 20 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , MgCl ₂ 20 mM	5 µl	2,5 µl
dNTPs 10mM	dATP, dTTP, dGTP, dCTP	200 µM	200 µM
Cebador LITSR	5'- CTG GAT CAT TTT CCG ATG - 3'	0,3 µM	-
Cebador L5.8S	5'- TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT - 3''	0,3 µM	-
Cebador SAC	5'- CAT TTT CCG ATG ATT ACA CC - 3'	-	0,3 µM
Cebador VAN2	5'- GCG ACA CGT TAT GTG AGC CG - 3	-	0,3 µM
Tth ADN polimerasa 1U/µl		0,028 U	0,028 U
ADN		10µl	10µl*
Agua destilada estéril		Hasta 50 µl	Hasta 25µl

Tabla III.3. Componentes para las reacciones de PCR.* 10 µl de la dilución de 25 µl del primer producto de PCR en 1ml de agua destilada y estéril.

	Hot start		Ciclos 30X			Extensión final
			Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	
Primera reacción	80°C 2min	94°C 5min	94°C 30seg	53°C 30seg	72°C 30seg	72°C 5min
Segunda reacción	80°C 2min	94°C 5min	94°C 30seg	57°C 30seg	72°C 30seg	72°C 5min

Tabla III.4. Programa de amplificación para la nPCR.

Una variante de ésta es una PCR directa con los cebadores SAC y VAN2, utilizada en el estudio 3, cuyo producto amplificado es de 280 a 330 pb. Las condiciones de reacción se describen en las tablas III.5 y III.6.

Composición		Reacción
Tampón de reacción 10X	75 mM Tris HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 20 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , MgCl ₂ 20 mM	5 µl
dNTPs 10mM	dATP, dTTP, dGTP, dCTP	200 µM
Cebador SAC	5'- CAT TTT CCG ATG ATT ACA CC - 3'	0,3 µM
Cebador VAN2	5'- GCG ACA CGT TAT GTG AGC CG - 3'	0,3 µM
Tth ADN polimerasa 1U/µl		0,028 U
ADN		10µl
Agua destilada estéril		Hasta 50 µl

Tabla III.5. Componentes para la PCR.

	Hot start		Ciclos 30X			Extensión final
			Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	
Condiciones de reacción	80°C 2min	94°C 5min	94°C 30seg	57°C 30seg	72°C 30seg	72°C 5min

Tabla III.6. Programa de amplificación para la PCR.

III.2.2.3. MINICIRCULOS DEL ADN DEL KINETOPLASTO (kDNA)

Se trata de una PCR directa, que amplifica una región variable de los minicirculos del ADN del kinetoplasto de *Leishmania*, basada en los cebadores diseñados por Aransay y col., 2000, amplificando una región de aproximadamente 800 bp.

Los cebadores utilizados para la amplificación y las condiciones de trabajo se encuentran descritos en las tablas III.7 y III.8.

Composición		Reacción
Tampón de reacción 10X	75 mM Tris HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 20 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , MgCl ₂ 20 mM	5 µl
dNTPs 10mM	dATP, dTTP, dGTP, dCTP	200 µM
Cebador LIN R4	5'-GGT TGG TGT AAA ATA GGG-3'	0,3 µM
Cebador LIN 19	5'-GAA CGC CCC TAC CCG-3'	0,3 µM
Tth ADN polimerasa 1U/µl		0,028 U
ADN		10µl
Agua destilada estéril		Hasta 50 µl

Tabla III.7. Componentes para la reacción de PCR.

	Hot start		Ciclos 30X			Extensión final
			Desnatu- ralización	Alinea- miento	Extensión	
Condiciones de reacción	80°C 2min	94°C 5min	94°C 30seg	70°C 30seg	72°C 30seg	72°C 5min

Tabla III.8. Programa de amplificación para la PCR.

III.2.2.4. MATERIALES PARA PCR

- i) Termociclador Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems).
- ii) dNTP mix a concentración equimolar de dATP, dCTP, dGTP, y dTTP (Biotools).
- iii) Los oligonucleótidos empleados en las reacciones fueron sintetizados por Sigma (Sigma-Genosis).

iv) La enzima polimerasa utilizada fue ADN Polimerasa recombinante "Biotools DNA Polymerase 1U/ul-Standard Reaction Buffer" y tampón 10X con 2 mM MgCl₂ (Biotools).

III.2.3. VISUALIZACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Se realizó una electroforesis (120V durante 50 minutos) de 20 µl de cada producto de PCR, en gel de agarosa al 1,5% ó 2,0% según el caso, con Ultra Pure Agarose (Invitrogen) en TBE 1X. Al producto de PCR se le adicionaron 4 µl de tampón de carga de azul bromofenol 6X. El gel se tiñó con 1,5 µl de bromuro de etidio (solución 10 mg/ml).

Junto a las muestras a visualizar se utilizó el marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) (ver figura 5.16).

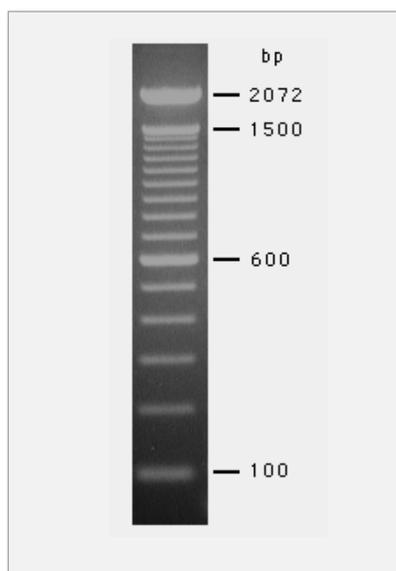


Figura III.1. Marcador de peso molecular.

Reactivos:

TAMPÓN DE CARGA: 0,1 gr azul de bromofenol, 0,1 gr de xileno cianol y 6 gr de ficoll, disueltos en 35 ml de agua destilada y enrasado hasta 40 ml con agua destilada. Proteger el bote de la luz con papel aluminio y almacenar a 4°C.

III.2.4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

III.2.4.1. PURIFICACIÓN DE AMPLIFICADOS

Las muestras positivas se purificaron utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen).

Procedimiento:

Nota:

- Este protocolo está indicado para la purificación de fragmentos de ADN de más de 5 µg (70 pb a Kb).
 - El tampón amarillo **QG** indica un pH \leq 7,5. La adsorción del ADN a la membrana es eficiente sólo a \leq de 7,5.
 - Añadir etanol al 95-100% al tampón **PE** concentrado antes de usar (ver la señal en la botella).
 - Se requiere isopropanol (100%) y termobloque o baño a 50°C.
 - Todos los pasos de centrifugación son llevados a cabo a 13.000 rpm
1. Extraer el ADN del gel de agarosa con un bisturí limpio.
 2. Pesar el fragmento de agarosa extraído en un tubo incoloro. Añadir 3 volúmenes de tampón QG por volumen de gel (100 mg de gel~ 100 µl). La máxima cantidad de gel que admite la columna es de 400 mg. Para geles de más del 2% de agarosa añadir 6 volúmenes de tampón QG.
 3. Incubar a 50°C 10 minutos (o hasta que el gel esté completamente disuelto). Agitar el tubo cada 2-3 minutos para ayudar a disolver el gel.
 4. Después de que el gel esté completamente disuelto, observar que el color de la muestra es amarillo (similar al del tampón QG sin agarosa disuelta). Si el color de la mezcla es naranja o violeta, añadir 10 µl 3 M de acetato sódico, pH 5,0 y mezclar. El color de la mezcla se volverá amarillo.
 5. Añadir un volumen de isopropanol a la mezcla y mezclar por inversión.
 6. Colocar la columna en el tubo recolector de 2 ml suministrado.
 7. Añadir la muestra a la columna y centrifugar 1 min. Descartar el fluido sobrante y volver a colocar el tubo recolector en la columna.
 8. Añadir 500 µl de tampón QG a la columna y centrifugar 1 min. Descartar el fluido sobrante y volver a colocar el tubo recolector en la columna.
 9. Añadir 750 µl de tampón PE a la columna y centrifugar un minuto. Descartar el fluido sobrante y volver a colocar el tubo recolector en la columna.

10. Centrifugar la columna 1 min. El etanol residual no es eliminado antes de esta segunda centrifugación.
11. Colocar la columna en un tubo limpio de 1,5 ml. Para eluir el DNA añadir 10 µl de tampón EB (10 Mm Tris-HCL, pH 8,5) o agua. Dejar reposar 1 min y centrifugar la columna 1 min.
12. Si el ADN purificado es para analizar en un gel, añadir 1 volumen de tampón de carga por cada 5 volúmenes de ADN purificado.

III.2.4.2. DIGESTION MEDIANTE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN (PCR-RFLP)

Con objeto de caracterizar las especies de *Leishmania*, los productos amplificados de la PCR se someten a digestión con enzimas (actividad endonucleasa). Si los amplicones presentan una variación de la secuencia nucleotídica en los sitios de reconocimientos de las enzimas de restricción, generarán distintos patrones de fragmentos.

III.2.4.2.1. *Hae III*.

Análisis de los fragmentos de restricción obtenidos de la digestión con la enzima *Hae III* de los productos de PCR de la segunda reacción de amplificación de ITS-1. Con 17 µl del producto de PCR purificado 2 µl de buffer de la enzima y 1 µl de enzima *HaeIII* (10 U) en un volumen de reacción total de 20 µl siguiendo las instrucciones del fabricante (*HaeIII* from *Haemophilus aegyptius* 5000 U a 1 U/µl, Roche).

Programa de incubación: 3 horas a una temperatura de 37°C.

Visualización de los productos en gel de agarosa al 2%.

Resultados esperados (de acuerdo a Schönian y col., 2003):

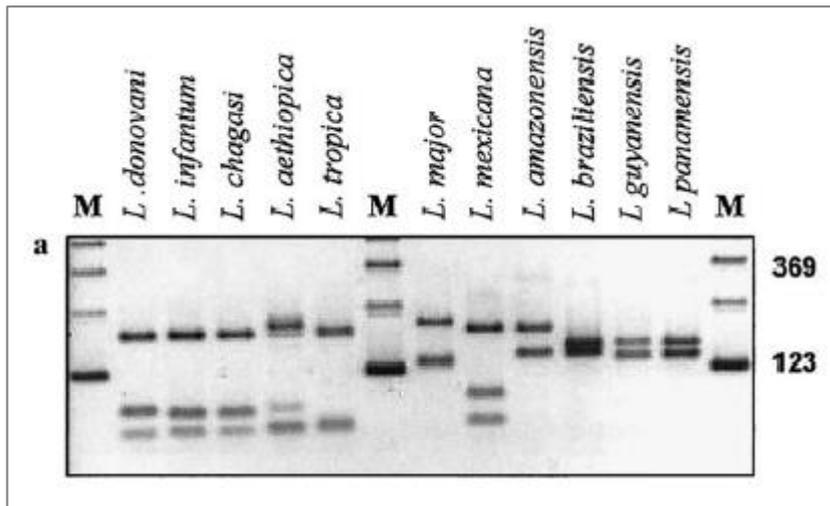


Figura III.2. Digestión con la enzima *Hae* III del producto amplificado de la región ITS-1 de diferentes especies de *Leishmania* (Schönian y col., 2003).

III.2.4.2.2. *Rsa* I.

Análisis de los fragmentos de restricción obtenidos de la digestión con la enzima *Rsa* I de los productos de PCR de del kDNA. Con 17 μ l del producto de PCR purificado 2 μ l de buffer de la enzima y 1 μ l de enzima *Rsa* I (10 U) en un volumen de reacción total de 20 μ l siguiendo las instrucciones del fabricante (*Rsa* I from *Rhodopseudomonas sphaeroides* 1.000 U a 10 U/ μ l, Roche).

Programa de incubación: 3 horas a una temperatura de 37°C.

Visualización de los fragmentos de restricción y comparación del patrón de bandas en gel de agarosa al 2%.

III.2.4.3. SECUENCIACIÓN

Se procedió a la secuenciación de los productos de PCR, con objeto de comprobar a qué especie pertenecía la secuencia obtenida del fragmento amplificado.

Para la secuenciación se utilizó el Big-Dye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit V3.1 (Applied Biosystems) y el secuenciador automatizado ABI PRISM 377 DNA (Applied Biosystems).

Como cebador se utiliza cada uno de los cebadores utilizados en la PCR por separado. Es decir, de cada producto de PCR se harán dos PCR de secuenciación utilizando, en cada una, uno de los dos cebadores utilizados en la PCR.

Para cada PCR se utilizaron:

Composición		PCR
Tampón de reacción 5X		1 μ l
Cebador	Cada uno en su caso	3,2 pmol
DNA problema:		1 μ l
Agua destilada y estéril		Hasta 20 μ l

Tabla III.9. Condiciones de la PCR para secuenciación.

III.2.4.4. ANÁLISIS DE SECUENCIAS

El análisis y edición de secuencias se llevó a cabo con el programa BioEdit versión 7.1.3 ©1997-2011: Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, 92008 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) y la comparación con las secuencias depositadas en la base de datos de GeneBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>; National Center for Biotechnology Information (NCBI, U.S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, BethesdaMD, 20894USA).

ANEXO IV. ABREVIATURAS

®	Marca registrada
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micrómetro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNg	ADN genómico
ADNk	ADN del kinetoplasto
ADNn	ADN nuclear
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BCG	Bacillus de Calmette y Guérinas
Caso Leish	Caso infectado por <i>Leishmania</i>
CD4+	Células T tipo 4 activadas
CD8+	Células T tipo 8 activadas
Col.	Colaboradores
DAT	Direct agglutination test (Test de aglutinación directa)
dNTPs	Desoxinucleósidos fosfato
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético sódico
EE.UU.	Estados Unidos
ELISA	Enzimoimmunoensayo
FAST	fast agglutination screening test (Test rápido de aglutinación para cribado)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GP	Ganglio poplíteo
gr	Gramo
H	histona
h	Hora
H ₂ O bd	Agua bidestilada
HCl	Ácido clorhídrico
HSPB1	Proteína de shock térmico de 27kDa
IA	Incidencia acumulada
IC	Intervalo de confianza
ICT	Test inmunocromatográfico rápido
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN	Interferón

Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IRD	Institut de Recherche pour le Développement (Instituto de investigación para el desarrollo)
ISCI	Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España
ITS-1	Intergenic transcribed spacer region 1 (Espaciador intergénico 1)
K39	Secuencia repetida de 39 aminoácidos de cinesina
Kb	Kilobases
KCl	Cloruro potásico
kDa	kilodaltons
kDNA	ADN del kinetoplasto
Km	Kilómetros
LACK	Receptor para activar la kinasa c
LC	Leishmaniosis cutánea
LCan	Leishmaniosis canina
LDPK	Leishmaniosis dérmica post kala-azar
LeIF	Factor de elongación e iniciación de <i>Leishmania</i>
Lip	Proteína ácida ribosomal
LMC	Leishmaniosis mucocutánea
LmSTI1	<i>Leishmania major</i> stress-inducible protein 1 (Proteína inducible de estrés 1 de <i>Leishmania major</i>)
LnPCR	Leishmania nested PCR (PCR anidada de Leishmania)
LV	Leishmaniosis visceral
LVA	Leishmaniasis visceral antroponótica
LVZ	Leishmaniosis visceral zoonótica
M	Molar
MAS	Muestreo aleatorio simple
MDP	Muramil dipéptido
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Micromolar
mm	Milímetros
MO	Médula ósea
NaCl	Cloruro sódico
Naïve	Ingenuo/desnudo o sin predisposición
Nested-PCR	PCR anidada

ng	nanogramo
NL	Nódulo linfático
nm	nanómetro
NNN	Medio Novi-McNeal-Nicolle
NTDs	<i>neglected tropical diseases</i> (Enfermedades tropicales olvidadas)
°C	Grados centígrados
OIE	Organización Mundial de la Salud Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización panamericana de salud
P	Proteína acídica ribosomal
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate buffered saline (tampón salino con fosfato)
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena por la polimerasa)
pH	Potencial de hidrógeno
pmol	Picomoles
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción)
rK39	Proteína recombinante de K39
rK39-ICT	Test inmunocromatográfico rápido basado en el antígeno rK39
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	medio Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	PCR a tiempo real
S	Sur
SDS	dodecilsulfato sódico
Seg	segundos
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SP	Sangre periférica
sp	especie
SP15	Sandfly salivary protein (Proteína salivar del mosquito)
spp	Cualquier especie del género
SSUrRNA	Small subunit of ribosomal RNA (Subunidad pequeña del ARN ribosomal)
TBE	Tris/borato/EDTA
TGF	Factor de crecimentotumoral
Th	Linfocitos T helper (colaboradores)
TNF	Factor de necrosis tumoral
TSA	Proteína antioxidante específica de tiol

U	Unidades
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
W	Oeste
WHO	World health organization (Organización Mundial de la Salud)
X	Microscopio: Factor de amplificación del objetivo (Aumentos)

ANEXO V: TRABAJOS PUBLICADOS

RESEARCH ARTICLE

Open Access

A canine leishmaniasis pilot survey in an emerging focus of visceral leishmaniasis: Posadas (Misiones, Argentina)

Israel Cruz^{1*}, Lucrecia Acosta², Mariana N Gutiérrez^{3,4}, Javier Nieto¹, Carmen Cañavate¹, Jorge Deschutter^{3,4}, Fernando J Bornay-Llinares²

Abstract

Background: An increasing number of reports are calling our attention to the worldwide spread of leishmaniasis. The urbanization of zoonotic visceral leishmaniasis (VL) has been observed in different South American countries, due to changes in demographic and ecological factors. In May 2006, VL was detected for the first time in the city of Posadas (Misiones, Argentina). This event encouraged us to conduct a clinical and parasitological pilot survey on domestic dogs from Posadas to identify their potential role as reservoirs for the disease.

Methods: One hundred and ten dogs from the city of Posadas were included in the study. They were selected based on convenience and availability. All dogs underwent clinical examination. Symptomatology related to canine leishmaniasis was recorded, and peripheral blood and lymph node aspirates were collected. Anti-*Leishmania* antibodies were detected using rK39-immunocromatographic tests and IFAT. Parasite detection was based on peripheral blood and lymph node aspirate PCR targeting the *SSUrRNA* gene. Molecular typing was addressed by DNA sequence analysis of the PCR products obtained by *SSUrRNA* and ITS-1 PCR.

Results: According to clinical examination, 69.1% (76/110) of the dogs presented symptoms compatible with canine leishmaniasis. Serological analyses were positive for 43.6% (48/110) of the dogs and parasite DNA was detected in 47.3% (52/110). A total of 63 dogs (57.3%) were positive by serology and/or PCR. Molecular typing identified *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) as the causative agent.

Conclusions: This work confirms recent findings which revealed the presence of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *L. infantum* in this area of South America. This new VL focus could be well established, and further work is needed to ascertain its magnitude and to prevent further human VL cases.

Background

In South America *Leishmania infantum* (syn. *Leishmania chagasi*) is the causative agent of visceral leishmaniasis (VL), a systemic infection which is fatal if not treated. The primary vectors are *Lutzomyia longipalpis* female sand flies, and infected domestic dogs are the main reservoirs [1]. However, Dantas-Torres recently highlighted the need to use proper diagnostic tools to identify the species of *Leishmania* involved in each case of canine leishmaniasis irrespective of the clinical

form [2]; this is an important issue to take into account when a new focus is being described.

The worldwide incidence of VL is estimated to be 500000 cases/year, with more than 50000 related deaths. In several areas of the world, there is a clear and disturbing increase in the number of VL cases. For example, in Northeastern Brazil the incidence raised from 1840 cases in year 1998 to 6000 in 2002 [3].

At present, a growing number of reports are calling our attention to a worldwide spread of leishmaniasis, including the urbanization of VL in different South American countries due to changes in demographic and ecological factors [4-8].

* Correspondence: cruzi@isciii.es

¹WHO Collaborating Centre for Leishmaniasis, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo, km 2, 28220 Majadahonda-Madrid, Spain
Full list of author information is available at the end of the article

An example of the latter is the recent report by Salomón, *et al.* [9] on the first urban VL focus in Posadas (Misiones, Argentina), which appeared in 2006 involving humans and dogs. That work indicated both: i) the presence of *Lu. longipalpis* in Misiones, where it was reported previously to be anecdotal [10] and ii) the presence of *Leishmania sp.* infection in 13 out of 27 dogs studied [9]. At present, 58 human VL cases have been reported in Posadas (2 in year 2006, 14 in 2007, 17 in 2008, 24 in 2009 and one up to April 30th 2010), with 6 related deaths [[11], Misiones Ministry of Health personal communication].

Encouraged by the emergence of the first human VL cases, we conducted a canine serological and parasitological pilot survey to: i) identify *Leishmania* infection in dogs, and thus their possible role as reservoirs, and ii) identify de *Leishmania* species circulating in this emerging VL focus.

Methods

Study location

The serological and parasitological pilot survey was conducted from 1 July to 15 August 2006 in the city of Posadas (27°23'S, 55°54'W), located in the southwest of Misiones province, Northeast Argentina.

Misiones is bordered by Brazil to the north and by Paraguay to the east. The city of Posadas has a global surface of 324 Km², and is characterized by a subtropical humid climate; annual rain is 1700 mm and average temperature 21.5°C. Posadas, which accounts for 29% of the total population of the province, had an estimated population of 297499 inhabitants in 2008; 98.8% from urban areas and 32.6% below the poverty line [12].

Study animals and samples

Our study was based on a convenience sample of 110 dogs originating from two sources: i) 83 dogs from two different canine shelters, located in the outskirts of Posadas, which admit dogs from the city: 59 from the non-profit civil association 'El Refugio' (Itaembé Mini area) and 24 from the Municipal Animal Health Institute-IMUSA (El Zaimán area), and ii) 27 dogs with owners that attended a local veterinary clinic for routinely care.

All dogs underwent clinical examination by a local veterinarian, searching for symptoms related to canine leishmaniasis (CanL). The presence of one or more of the following was considered for the clinical diagnosis of CanL: lymphadenopathy, onychogryphosis, skin lesions, weight loss, conjunctivitis and alopecia.

After examination one ml peripheral blood (PB) was obtained from 110 dogs and collected in EDTA-containing tubes; lymph node aspirates (LN) were obtained from 94 dogs and further diluted in 500 µl ethanol 70%. Once

obtained, samples were stored at 4°C until shipment to the WHO Collaborating Centre for Leishmaniasis (Madrid, Spain) for serological and molecular diagnosis.

Informed consent was obtained from each dog owner and from the canine shelter responsible before clinical examination and sampling of the dogs. Research procedures were approved by the corresponding research review boards of Universidad Miguel Hernández and Misiones Ministry of Public Health.

Serological diagnosis

Anti-*Leishmania* antibodies detection was performed by two different approaches: a) rK39-immunochromatographic test (rK39-ICT; Kalazar Detect™ Rapid test, InBIOS International, Seattle, WA), using 25 µl of peripheral blood and following the manufacturer's instructions; and b) Immunofluorescence antibody test (IFAT) following a standard method, using 10 µl of 2×10^7 *L. infantum* promastigotes/ml in 1× PBS per well as antigen (reference strain MHOM/FR/78/LEM-75) and 1 µl plasma for the analysis. The IFAT threshold titre for positivity was 1/160 [13]. Considering the present work a pilot study, replicate testing of the samples was not performed.

Molecular diagnosis

Parasite detection was done by means of nested-PCR targeting the *Leishmania SSUrRNA* gene (LnPCR) as described elsewhere, this protocol is *Leishmania* genus specific and uses the primer pair R221 (5'-GGT TCC TTT CCT GAT TTA CG-3') and R332 (5'-GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG-3') in the first reaction, and the primer pair R223 (5'-TCC CAT CGC AAC CTC GGT T-3') and R333 (5'-AAA GCG GGC GCG GTG CTG-3') in the nested reaction [14]. Starting material for DNA extraction was: i) 100 µL PB and ii) the pellet obtained after centrifugation (6000 rpm in a benchtop microcentrifuge for 10 min) and PBS 1× washing of the LN dilution obtained from each dog. DNA was extracted by conventional phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation and further eluted in 100 µl sterile distilled water.

Molecular typing of the parasites

Leishmania molecular typing was carried out by sequence analysis of both the LnPCR products obtained from PB and LN samples, and the ITS-1 PCR products obtained from PB samples of LnPCR positive dogs. ITS-1 PCR was performed as described elsewhere with the primer pair LITSR (5'-CTG GAT CAT TTT CCG ATG-3') and L5.8S (5'-TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT-3') and used only for typing purpose [15]. Direct sequencing of the PCR products was performed with forward and reverse primers; using the Big-Dye

Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit V3.1 and the automated ABI PRISM 377 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Sequences obtained were analyzed and edited using Lasergene® sequence analysis software (DNASTAR, Madison, WI).

Statistical analyses

Data recorded during the clinical examination and results from serological analyses were introduced in an Excel® data sheet (Microsoft Office 2003). The association between the different variables was analyzed with the SPSS statistical software version 16.0, using the chi-square test with Yate's correction. A p-value of <0.05 was considered as statistically significant.

Results

Clinical examination

Dogs were grouped according to their age in four different groups. Group 1 (≤ 1 year) consisted in 23/110 dogs (20.9%), group 2 (2-5 years) in 55/110 (50.0%), group 3 (6-10 years) in 18/110 (16.4%), and group 4 (>10 years) in 14/110 (12.7%). Male/female ratio for all groups together was 1.5/1 (66 male/44 female). Eighty-three out of the 110 dogs (75.4%) were mongrel and 27/110 (24.6%) were from different breeds.

After clinical examination, 34 out of 110 dogs (30.9%) were classified as asymptomatic, while 76/110 (69.1%) presented one or more clinical signs related to canine leishmaniasis. The frequency of the different symptoms in the 76 symptomatic dogs is presented in table 1. Nineteen out of the 76 symptomatic (25%) dogs were classified as oligosymptomatic (1 or 2 symptoms), while 57 (75%) were classified as polysymptomatic (more than 3 symptoms).

Serological and molecular diagnosis

All dogs were analyzed by rK39-ICT and/or IFAT. rK39-ICT was positive in 42/109 (38.5%) of the dogs, and IFAT in 40/102 (39.2%). The combination of both serological methods indicated that 48/110 (43.6%) of them were seropositive. For 101 dogs tested by both serological methods, the concordance between rK39-ICT and IFAT results was 90.1%. Dogs were considered as

seropositive when rK39-ICT and/or IFAT yielded a positive result.

All dogs were analysed by PB-LnPCR and/or LN-LnPCR. *Leishmania* DNA was detected in PB of 23/109 (21.1%) and in LN of 47/94 (50.0%) of the dogs studied. The combination of both PCR approaches detected the parasite DNA in 52/110 (47.3%) dogs. For 93 dogs on which PCR was performed on both biological samples the concordance of PCR results was 63.4%. Dogs were considered as parasite positive when leishmanial DNA was detected by PB-LnPCR and/or LN-LnPCR.

Dogs were considered as infected when they were seropositive and/or parasite positive. Table 2 provides a detailed description of serology and PCR results with regards to the origin, sex, breed, age group and clinical status of 110 dogs on which both serology and PCR data were available.

Figure 1 shows a flowchart including data on clinical examination, the number of samples processed by each diagnostic test and those testing positive. The number of dogs positive with one, two, three or four diagnostic approaches according to their clinical status is shown in Table 3.

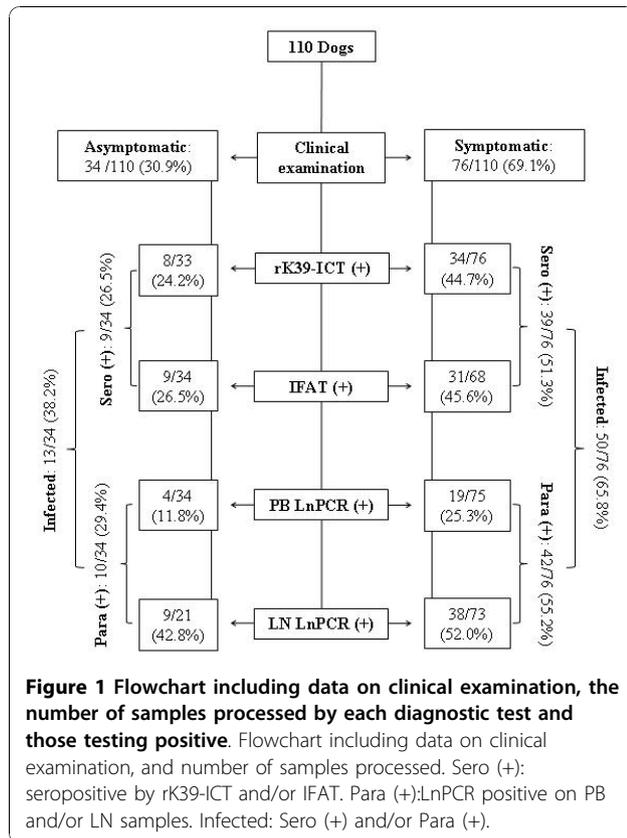
Table 2 Detailed description of serology and PCR results with regards to different parameters in 110 dogs

		Sero-pos*	Parasite-pos**	Infected***
Origin	Owner (N = 27)	14 (51.8%)	14 (51.8%)	18 (66.7%)
	Canine shelter (N = 83)	34 (40.9%)	38 (45.8%)	45 (54.2%)
Sex	Male (N = 66)	30 (45.4%)	32 (48.5%)	40 (60.6%)
	Female (N = 44)	18 (40.9%)	20 (45.4%)	23 (52.3%)
Breed	Defined breed (N = 27)	16 (59.2%)	11 (40.7%)	16 (59.2%)
	Mongrel (N = 83)	32 (38.5%)	41 (49.4%)	47 (56.6%)
Age Group	Group 1 (N = 23)	12 (52.2%)	12 (52.2%)	15 (65.2%)
	Group 2 (N = 55)	24 (43.6%)	29 (52.7%)	34 (61.8%)
	Group 3 (N = 18)	5 (27.8%)	7 (38.9%)	7 (38.9%)
	Group 4 (N = 14)	7 (50.0%)	4 (28.6%)	7 (50.0%)
Clinical status	Symptomatic (N = 76)	39 (51.3%)	42 (55.3%)	50 (65.8%)
	Asymptomatic (N = 34)	9 (26.5%)	10 (29.4%)	13 (38.2%)
Total	(N = 110)	48 (43.6%)	52 (47.3%)	63 (57.3%)

*Sero-pos: seropositive by rK39-ICT and/or IFAT. **Parasite-pos: LnPCR positive on PB and/or LN samples. ***Infected: Sero-pos and/or Parasite-pos.

Table 1 Frequency of signs/symptoms related to canine leishmaniasis in 76 symptomatic dogs

Symptoms	Frequency (%)
Skin lesions	73/76 (96.0%)
Lymphadenopathy	68/76 (89.5%)
Onychogryphosis	47/76 (61.8%)
Weight loss	38/76 (50.0%)
Conjunctivitis	32/76 (42.1%)



Molecular typing of the parasites

DNA sequences from LnPCR products were obtained for 23 PB and 45 LN samples from 53 different dogs. And DNA sequences from ITS-1 PCR products were obtained for PB samples from 17 different dogs. Once edited the sequences obtained were used for BLAST search against GenBank™ database [16]. The sequences obtained from the LnPCR products returned 100% identity with *SSUrRNA* gene sequences of *Leishmania donovani* complex species (*L. infantum*, *L. donovani*), while the sequences obtained from the ITS-1 PCR products returned 100% identity with ITS-1 sequences of *L. infantum*.

Statistical analyses

No statistical association was observed between infection and age group ($p = 0.279$), sex ($p = 0.387$) or origin

($p = 0.256$). However there was a significant association between symptomatology and infection ($p = 0.007$). Furthermore, a significant association between number of symptoms and infection ($p = 0.019$) was observed. Particularly, the presence of the following symptoms presented significant association with infection: lymphadenopathy, onychogryphosis and conjunctivitis ($p < 0.05$); while skin lesions and weight loss were not associated ($p > 0.05$).

Discussion

Leishmania infection was confirmed either by molecular and/or serological methods in 63/110 (57.3%) dogs. Current entomological data reporting the presence of *Lu. longipalpis* in Posadas [9], together with the presence of *L. infantum* infection in urban dogs indicates that the transmission cycle of zoonotic VL (ZVL) could be well established, and that further cases of human VL are likely to appear. It has been shown in Brazil that human epidemics of VL are usually preceded, or concomitant to high infection rates in the canine population [17-19]. The emergence of 58 human VL cases in Posadas since 2006 supports this possibility. The limitations of this pilot study, based on a convenience sampling, do not allow drawing solid conclusions. In addition most of the dogs (83/110) were from a canine shelter, thus the data do not have the power of a population-based random sampling study to provide a view of the real prevalence of *Leishmania* infection in the canine population. However the data present a consistent picture of this emerging focus of ZVL.

Infected symptomatic dogs are considered to be the main reservoirs of ZVL leishmaniasis, in the present study these represent 45.4% (50/110) of the dogs studied. However, infected asymptomatic dogs are also said to play a role in transmission [20-22], in this study these represent 11.8% (13/110) of the total. In spite of the statistical association between infection and symptomatology, the present study also highlights the low specificity of the clinical diagnosis of CanL; in fact 34.2% (26/76) of the symptomatic dogs (one or more of the before mentioned symptoms) presented negative results for both serology and PCR. Thus, as suggested by recent reviews, reliable laboratory-based diagnostic tests should

Table 3 Number of dogs analyzed by all 4 diagnostic methods testing positive with one, two, three or four diagnostic approaches (rK39-ICT, IFAT, PB-LnPCR and LN-LnPCR) according to their clinical status

Number of positive tests	Total N = 85 (%)	Asymptomatic N = 20 (%)	Symptomatic N = 65 (%)
0	32/85 (37.6)	11/20 (55.0)	21/65 (32.3)
1	14/85 (16.4)	3/20 (15.0)	11/65 (16.9)
2	10/85 (11.7)	1/20 (5.0)	9/65 (13.8)
3	15/85 (17.6)	2/20 (10.0)	13/65 (20.0)
4	14/85 (16.4)	3/20 (15.0)	11/65 (16.9)

be carried out either in clinical practice or in epidemiological studies [23,24].

In areas where ZVL is endemic the prevalence of infected dogs tends to be high, with a greater proportion of asymptomatic ones [25]. In the present study, and unlike what happens in traditional endemic areas for ZVL, most of the infected dogs were symptomatic. This could be due to a recent introduction of *L. infantum* in the area where, as a naïve population, most of the dogs infected would develop the disease. It is also reported in ZVL endemic areas an increasing prevalence of seropositive dogs with age, and a final decrease in those aged ≥ 7 years [26-28]. In dogs from the present study we observed no increase in seropositivity nor in parasite DNA detection related with the age of the dogs ($p > 0.05$). This finding could also be consistent with the hypothesis of a recent introduction of *L. infantum*. The results of the diagnostic tests employed also support the above mentioned. In the recent review by Baneth, *et al.* [29] it is stated that in endemic foci the number of PCR positive dogs will exceed the number of seropositive; however in the present study there were no great differences between the rates of infection detected by serology and PCR.

Concerning the serological test employed in this study (rK39-ICT and IFAT) they have presented a concordance of 90.1%. IFAT has long been considered as the *gold standard* in canine leishmaniasis serodiagnosis [1,30], and different rK39 rapid tests have also shown a good performance in field studies [31]. According to different authors their sensitivity ranges from 85.5 to 90% for IFAT and 72 to 96.7% for rK39-ICT, while their specificity ranges from 94.7 to 100% for IFAT and 61.75-100% for rK39-ICT [24,31-33]. However, Mettler *et al* [33] reported a lower sensitivity for these methods in asymptomatic infected dogs, 29.4% for IFAT and 52.9% for rK39-ICT. In our study no big differences were observed in the performance of these tests between asymptomatic and symptomatic dogs; In PCR-positive asymptomatic dogs rK39-ICT and IFAT were positive for 55.5% and 60% of the dogs respectively, while in PCR-positive symptomatic dogs both methods were positive for 66.6% of the dogs. Cross reactions with other infectious agents such as *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Neospora caninum*, *Hepatozoon canis* and *Trypanosoma cruzi* have also been described [31,33,34]. Some false-positive results of rK39-ICT have been also attributed to unknown blood factors present in dog blood [32]. Although we cannot categorically rule out cross-reactions with *T. cruzi* or *L. braziliensis* in our study, this is very unlikely as the presence of autochthonous infections by these parasites has not been reported in the city of Posadas, where this study took place.

With regards to the molecular typing of the parasites this is, to our knowledge and taking into account the review by Salomón *et al.* [9], the first report on molecular identification of autochthonous *L. infantum* infection in Argentina.

The recently established focus of human and canine VL in Asunción, Paraguay [35,36], could have been, because of its proximity, the source of the introduction of VL in Northern Argentina [37]. To ascertain the origin of the parasites in this new VL focus a wide population genetics based study involving *L. infantum* strains from different South American endemic areas could be very helpful. For this purpose multi locus microsatellite typing seems to be the most appropriate tool [38]. And to ascertain since when it is established, powerful epidemiological studies in human and canine population must be done. These studies should address: i) retrospective analyses of human and canine samples from patients/dogs attending the different health/veterinary centres in the area with symptoms compatible with human VL/CanL; ii) leishmanin skin test (in humans) and serological surveys (in both humans and dogs) to estimate the prevalence of parasite contact in different age groups.

Conclusions

This pilot study confirms the presence of CanL due to *L. infantum* in Posadas (Misiones, Argentina), an area where the disease has been recently reported. Though the present work has the limitations of not being a population-based random sampling study, and does not provide an accurate view of the real prevalence of *Leishmania* infection in the canine population of Posadas, it indicates that this new VL focus could be well established, and further work is needed to ascertain its magnitude and to prevent further human VL cases.

Acknowledgements

This work was supported by: Dirección General de Cooperación al Desarrollo, Generalitat Valenciana, Spain. And European Commission 6th Framework Programme INCO-CT-2005-015407 (Control strategies for visceral leishmaniasis (VL) and mucocutaneous leishmaniasis (MCL) in South America: Applications of molecular epidemiology/LeishEpiNetSA).

We especially acknowledge the essential collaboration of the canine shelters' responsible from the non-profit civil association 'El Refugio' and the Municipal Animal Health Institute-IMUSA. We would also like to thank Lucy A. Parker (Área de Salud Pública, Universidad Miguel Hernández de Elche, Alicante, Spain) for reviewing and editing of the manuscript.

Author details

¹WHO Collaborating Centre for Leishmaniasis, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo, km 2, 28220 Majadahonda-Madrid, Spain. ²Área de Parasitología, Universidad Miguel Hernández, Ctra. de Valencia km 8.7, 03550 Elche-Alicante, Spain. ³Cátedra de Parasitología, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones, 3300 Posadas, Misiones, Argentina. ⁴Ministerio de Salud Pública de Misiones, 3300 Posadas, Misiones, Argentina.

Authors' contributions

IC, LA, FJBL and JD conceptualized and designed the study. IC and LA drafted the manuscript; CC critically reviewed it and contributed to its design. FJBL coordinated the study. LA, MNG and JD contacted the dog owners and canine shelter that participated in the study. LA and MNG carried out clinical examination and obtained biological samples from the dogs. JN and MNG designed the protocol for clinical scoring of the dogs. IC, LA, JN and CC performed serological and molecular diagnosis. IC performed molecular typing of the parasites. All authors participated in the analysis and interpretation of data, revised the different draft versions, and read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 24 June 2010 Accepted: 1 December 2010

Published: 1 December 2010

References

- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J: **Canine Leishmaniasis.** *Adv Parasitol* 2004, **57**:1-88.
- Dantas-Torres F: **Canine leishmaniosis in South America.** *Parasit Vectors* 2009, **2**(Suppl 1):S1.
- Desjeux P: **Leishmaniasis: current situation and new perspectives.** *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004, **27**:305-318.
- Dujardin JC: **Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring?** *Trends Parasitol* 2006, **22**:4-6.
- Shaw J: **The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. A mini-review.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007, **102**:541-547.
- World Health Organization, Geneva: **Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis.** *Wkly Epidemiol Rec* 2002, **44**:365-370.
- Costa CHN: **Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil.** *Cad Saude Pública* 2008, **24**:2959-2963.
- Silva MR, Marques MJ, Romanha AJ, de Almeida Santa-Rosa IC, Carneiro CM, Barbosa Reis A: **Autochthonous canine visceral leishmaniasis in a non-endemic area: Bom Sucesso, Minas Gerais State, Brazil.** *Cad Saude Publica* 2008, **24**:281-286.
- Salomón OD, Sinagra A, Nevot MC, Barberian G, Paulin P, Estevez J, Riarte A, Estevez J: **First visceral leishmaniasis focus in Argentina.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008, **103**:109-111.
- Salomón OD, Sosa Estani S, Rossi GC, Spinelli GR: **Presencia de *Lutzomyia longipalpis* y situación de la leishmaniosis visceral en Argentina.** *Medicina (B Aires)* 2001, **61**:174-178.
- Deschutter J, Piragine R, Silva G, Bernard H, Borchichi S, Von Steiger L, Jordá G, Acosta L, Cruz I, Bornay-Llinares FJ: **Leishmaniosis visceral humana (LVH) en Misiones (Argentina). Estudio descriptivo retrospectivo (2006-2009).** *XIX Congreso Latinoamericano de Parasitología: 22-24 October 2009; Asunción, Paraguay* Federación Latinoamericana de Parasitología-FLAP; 2009, 233.
- Gobierno de la provincia de Misiones. [http://www.misiones.gov.ar/index.php?option=com_frontpage&Itemid=1].
- Bray RS: **Immunodiagnosis of leishmaniasis.** In *Leishmaniasis*. Edited by: Chang KP, Bray RS. Amsterdam, The Netherlands, Elsevier; 1985:177-182.
- Cruz I, Chicharro C, Nieto J, Bailo B, Cañavate C, Figueras MC, Alvar J: **Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**:2343-2347.
- Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, Jaffe CL: **PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003, **47**:349-358.
- Basic Local Alignment Search Tool. [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>].
- Margonari C, Freitas CR, Ribeiro RC, Moura ACM, Timbó M, Gripp AH, Pessanha JP, Dias ES: **Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006, **101**:31-38.
- Werneck GL, Costa CHN, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH: **Multilevel modeling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil.** *Epidemiol Infect* 2007, **135**:195-201.
- Queiroz PVS, Monteiro GRG, Macedo VPS, Rocha MAC, Batista LMM, Queiroz JW, Jerônimo SMB, Ximenes MFFM: **Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil.** *Res Vet Sci* 2009, **86**:267-273.
- Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J: **Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994, **88**:491-493.
- Michalsky EM, Rocha MF, da Rocha Lima AC, França-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, Pacheco RS, dos Santos SL, Barata RA, Romanha AJ, Fortes-Dias CL, Dias ES: **Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies.** *Vet Parasitol* 2007, **147**:67-76.
- Da Costa-Val AP, Cavalcanti RR, de Figueiredo Gontijo N, Michalick MS, Alexander B, Williams P, Melo MN: **Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity.** *Vet J* 2007, **174**:636-643.
- Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G: **Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two.** *Trends Parasitol* 2008, **24**:371-377.
- Maia C, Campino L: **Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection.** *Vet Parasitol* 2008, **158**:274-287.
- Dantas-Torres F, Brito MEF, Brandão-Filho SP: **Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil.** *Vet Parasitol* 2006, **140**:54-60.
- Martínez Cruz MS, Martínez Moreno A, Martínez Moreno FJ, Martínez Gómez F, Hernández Rodríguez S: **Epidemiología de la leishmaniosis canina en Córdoba.** *Revista Ibérica de Parasitología* 1990, **50**:1-7.
- Abranches P, Silva-Pereira MCD, Conceição-Silva FM, Santos Gomes GM, Janz JG: **Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection.** *J Parasitol* 1991, **77**:557-561.
- Fisa R, Gállego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, Carrió J, Gállego J, Portús M: **Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) The example of the Priorat focus.** *Vet Parasitol* 1999, **83**:87-97.
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gállego L, Bourdeau P, Ferrer L: **Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one.** *Trends Parasitol* 2008, **24**:324-330.
- Gradoni L: **The diagnosis of canine leishmaniasis. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution.** *Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum, Sevilla, Spain* Intervet International; 2002, 7-14.
- Lemos EM, Laurenti MD, Batistela Moreira MA, Barbosa Reis A, Cordeiro Giunchetti R, Raychaudhuri S, Dietze R: **Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect™) on dogs with and without signs of the disease.** *Acta Trop* 2008, **107**:205-207.
- Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B, Davies CR: **Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: Comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**:2352-2356.
- Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H, Deplazes P: **Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**:5515-5519.
- Mancianti F, Pedonese F, Poli A: **Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniasis as compared with indirect immunofluorescence assay.** *Vet Parasitol* 1996, **65**:1-9.
- Canese A: **Leishmaniosis visceral canina en el área metropolitana de la "Gran Asunción", Paraguay.** *Medicina (B Aires)* 2000, **60**(Supl III):65.
- Cousiño B: **Vigilancia y Control de la Leishmaniasis en el Paraguay.** *Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas, Panaftosa, Rio de Janeiro, Brazil* Organización Panamericana de la Salud; 2006, 34-36.
- Salomón OD, Quintana MG, Bruno MR, Quiriconi RV, Cabral V: **Visceral leishmaniasis in border areas: clustered distribution of phlebotomine sand flies in Clorinda, Argentina.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009, **104**:801-804.

38. Kuhls K, Keilonat L, Ochsenreither S, Schaar M, Schweynoch C, Presber W, Schönian G: **Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis.** *Microbes Infect* 2007, **9**:334-343.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/10/342/prepub>

doi:10.1186/1471-2334-10-342

Cite this article as: Cruz et al.: A canine leishmaniasis pilot survey in an emerging focus of visceral leishmaniasis: Posadas (Misiones, Argentina). *BMC Infectious Diseases* 2010 **10**:342.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- Abranches P, Silva FMC, Ribeiro MM, Lopes FJ y Gomes LT (1983). Kala-azar in Portugal--IV. The wild reservoir: the isolation of a *Leishmania* from a fox. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 77:420-421.
- Abranches P, Silva-Pereira MCD, Conceição-Silva FM, Santos Gomes GM y Janz JG (1991). Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol*, 77:557-561.
- Adler S y Theodor O (1932). Investigations on Mediterranean Kala-azar. VI. Canine visceral leishmaniasis. *Proc R Soc Lond*, 110:402-412.
- Acardi SA, Liotta DJ, Santini MS, Romagosa CM, Salomón OD (2010). Detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and *Canis familiaris* in Misiones, Argentina: the first report of a PCR-RFLP and sequencing-based confirmation assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 105:796-799.
- Acedo-Sánchez C, Martín-Sánchez J, Velez-Bernal ID, Sanchis-Marín MC, Louassini M, Maldonado JA y Morillas-Marquez F (1996). Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada Province, southern Spain). *Int J Parasitol*, 26:303-310.
- Acuña M, Cassaubon A y Bettinotti SI (1924). Estudio anatómico-clínico de un caso de Kala Azar infantil (primera observación en nuestro país). *La Prensa Médica Argentina*, 11:585-593.
- Aebischer T, Moody SF y Handman E (1993). Persistence of virulent *Leishmania major* in murine cutaneous leishmaniasis: a possible hazard for the host. *Infect Immun*, 61(1):220-226.
- Albrecht H (1998). Leishmaniosis--new perspectives on an underappreciated opportunistic infection. *AIDS*, 12(16):2225-2226.
- Albuquerque PLMM, Silva Júnior GB, Freire CCF, Oliveira SBC, Almeida DM, Silva HF, Cavalcante Mdo S y Sousa Ade Q (2009). Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceará, Brazil. *Rev Panam Salud Pública*, 26(4):330-333.
- Aleixo JA, Nascimento ET, Monteiro GR, Fernandes MZ, Ramos AM, Wilson ME, Pearson RD y Jeronimo SM (2006). Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 100(1):79-82.
- Alencar JE (1959). Aspectos clínicos do calazar americano. *Rev Bras Malariol Doenças Trop*, 11:19-44.

- Alexander B, de Carvalho RL, McCallum H y Pereira MH (2002). Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Dis*, 8:1480-1485.
- Alexander B y Maroli M (2003). Control of phlebotomine sandflies. *Med Vet Entomol*, 17:1-18.
- Alexander B, Barros VC, de Souza SF, Barros SS, Teodoro LP, Soares ZR, Gontijo NF y Reithinger R (2009). Susceptibility to chemical insecticides of two Brazilian populations of the visceral leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Trop Med Int Health*, 14:1272-1277.
- Alexandre-Pires G, Pais D, Correia M y Pina JA (2006). Leishmaniosis-a report about the microvascular and cellular architecture of the infected spleen in *Canis familiaris*. *Microsc Res Tech*, 69:227-235.
- Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML, Alves LC, Berne ME y Atta AM (2005). Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol*, 127:227-232.
- Almeida B, Faria RP, Pimentel MF, Dahroug MA, Turbino NC y Sousa VR (2009). Seroepidemiological survey of canine leishmaniasis in endemic areas of Cuiabá, State of Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop* 42:156-159.
- Alonso DP, Costa DL, de Mendonça IL, Costa CHN y Ribolla PEM (2010). Short Report: Heterogeneity of *Leishmania infantum chagasi* Kinetoplast DNA in Teresina (Brazil). *Am J Trop Med Hyg*, 82(5):819-821.
- Altet L, Francino O, Solano-Gallego L, Renier C y Sánchez A (2002). Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. *Infect Immun*, 70:2763-2771.
- Alvar J, Molina R, San Andrés M, Tesouro M, Nieto J, Vitutia M, González F, San Andrés MD, Boggio J, Rodríguez F, Sáinz A y Escacena C (1994). Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol*, 88:371-378.
- Alvar J (2001). Las Leishmaniasis: De la biología al control. 2ª Edición. Laboratorios Intervet S.A. (Edit), Salamanca. 236 págs.
- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J y Nieto J (2004). Canine Leishmaniasis. *Adv Parasitol*, 57:1-88.
- Alvar J, Yactayo S y Bern C (2006). Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol*, 22:552-557.
- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, López-Vélez R y Moreno J (2008). The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev*, 21:334-359.

- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M y the WHO Leishmaniasis Control Team (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One*, 7(5):e35671.
- Alves WA y Bevilacqua P (2004). Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997. *Cad Saúde Pública*, 20:259-265.
- Alves CF, de Amorim IF, Moura EP, Ribeiro RR, Alves CF, Michalick MS, Kalapothakis E, Bruna-Romero O, Tafuri WL, Teixeira MM y Melo MN (2009). Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*, 128(4):349-358.
- Amalraj DD, Sivagnaname N y Srinivasan R (1999). Susceptibility of *Phlebotomus argentipes* and *P. papatasi* (Diptera: Psychodidae) to insecticides. *J Commun Dis*, 31:177-180.
- Amela C, Mendez I, Torcal JM, Medina G, Pachón I, Cañavate C y Alvar J (1995). Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *Eur J Epidemiol*, 11:157-161.
- Andrade HM, Toledo VPCP, Mayrink W y Genaro O (1999). Evaluation of the immune response and production of interferon in canine visceral leishmaniasis. *Revue Me'd Ve't*, 150:809-814.
- Andrade HM, Toledo VPCP, Marques MJ, França Silva JC, Tafuri WL, Mayrink W y Genaro O (2002). *Leishmania (Leishmania) chagasi* is not vertically transmitted in dogs. *Vet Parasitol*, 103:71-81.
- Andreotti R, Oliveira JM, Silva EA, Oshiro LM y Matos M de F (2006). Occurrence of *Neospora caninum* in dogs and its correlation with visceral leishmaniasis in the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Vet Parasitol*, 135:375-379.
- Angel SO, Requena JM, Soto M, Criado D y Alonso C (1996). During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response. *Acta Trop*, 62:45-56.
- Angelici MC, Gramiccia M y Gradoni L (1989). Study on genetic polymorphism of *Leishmania infantum* through the analysis of restriction enzyme digestion patterns of kinetoplasto DNA. *Parasitology*, 99:301-309.
- Antoniou M, Messaritakis I, Christodoulou V, Ascoksilaki I, Kanavakis N, Sutton AJ, Carson C y Courtenay O (2009). Increasing incidence of zoonotic visceral leishmaniasis on Crete, Greece. *Emerg Infect Dis*, 15:932-934.
- Aoun O, Mary C, Roqueplo C, Marié JL, Terrier O, Levieuge A, Davoust B (2009). Canine leishmaniasis in south-east of France: screening of *Leishmania infantum*

- antibodies (western blotting, ELISA) and parasitemia levels by PCR quantification. *Vet Parasitol*, 166: 27-31.
- Aransay AM, Scoulica E y Tselentis Y (2000). Detection and identification of *Leishmania* DNA within naturally infected sand flies by semi-nested PCR on minicircle kinetoplastic DNA. *Appl Environ Microbiol*, 66:1933-1938.
- Arias JR, Monteiro PS y Zicker F (1996). The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. *Emerg Infect Dis*, 2(2):145-146.
- Arjona-Jiménez G, Villegas N, López-Céspedes A, Marín C, Longoni SS, Bolio-González ME, Rodríguez-Vivas RI, Sauri-Arceo CH y Sánchez-Moreno M (2012). Prevalence of antibodies against three species of *Leishmania* (*L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. infantum*) and possible associated factors in dogs from Mérida, Yucatán, Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 106(4):252-258.
- Arnot DE y Barker DC (1981). Biochemical identification of cutaneous *Leishmania* by analysis of kinetoplast DNA II. Sequence homologies in *Leishmania* kDNA. *Mol Biochem Parasitol*, 3:47-56.
- Ashford DA, Badaró R, Eulalio C, Freire M, Miranda C, Zalis M y David JR (1993). Studies on the control of visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test-enzyme linked immunosorbent assay (Fast-ELISATM) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 48:1-8.
- Ashford RW (1996). Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol*, 14:523-532.
- Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulalio MC, Sampaio DP y Badaró R (1998). Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 59:53-57.
- Ashford RW (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol*, 30(12-13):1269-1281.
- Awasthi A, Mathur RK y Saha B (2004). Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res*, 119(6):238-258.
- Azevedo AC, Souza NA, Meneses CR, Costa WA, Costa SM, Lima JB y Rangel EF (2002). Ecology of sand flies (Diptera: psychodidae: phlebotominae) in the north of the state of Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(4):459-464.
- Badaró R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, Teixeira R y Johnson WD Jr (1986). New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, 154(6):1003-1011.
- Badaró R, Carvalho EM, Rocha H, Queiroz AC y Jones TC (1987). *Leishmania donovani*: an opportunistic microbe associated with progressive disease in three immunocompromised patients. *Lancet*, 1(8482):647-649.

- Badaró R, Benson D, Eulalio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, Pedral-Sampaio D, Madureira C, Burns JM, Houghton RL, David JR y Reed SG (1996). rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, 173:758-761.
- Baez-Villaseñor J, Ruiloba J, Rojas E, Trevino A y Campillo C (1952). Presentación de un caso de Kala-azar. *Rev Invest Clin*, 4(1):57-78.
- Baneth G y Shaw SE (2002). Chemotherapy of Canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 106:315-324.
- Baneth G y Aroch I (2008). Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *Vet J*, 175(1):14-15.
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gállego L, Bourdeau P y Ferrer L (2008). Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*, 24:324-330.
- Barbieri CL (2006). Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol*, 28:329-337.
- Barral A, Costa JM, Bittencourt AL, Barral-Netto M y Carvalho EM (1995). Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *Int J Dermatol*, 34(7):474-479.
- Barrouin-Melo SM, Larangeira DF, Trigo J, Aguiar PH, dos-Santos WL y Pontes-de-Carvalho L (2004). Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99(2):195-197.
- Bates PA (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*, 37:1097-1106.
- Belli A, Garcia D, Palacios X, Rodriguez B, Valle S, Videa E, Tinoco E, Marín F y Harris E (1999). Widespread atypical cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) chagasi* in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg*, 61:380-385.
- Benderitter T, Casanova P, Nashkidachvili L y Quilici M (1988). Glomerulonephritis in dogs with canine leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*, 82:335-341.
- Benítez LEL (1967). Leishmaniasis visceral. *Rev Asoc Med Arg*, 8:610-612.
- Bern C, Jha SN, Joshi AB, Thakur GD y Bista MB (2000). Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. *Am J Trop Med Hyg*, 63:153-157.
- Bern C, Maguire JH y Alvar J (2008). Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 2:e313.

- Bettini S, Pozio E y Gradoni L (1980). Leishmaniasis in Tuscany (Italy): (II) *Leishmania* form wild *Bodentia* and *Carnivora* in a human and canine leishmaniasis focus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 74(1):77-83.
- Bittencourt AL, Costa JM, Carvalho EM y Barral A (1993). Leishmaniasis recidiva cutis in American cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*, 32:802-805.
- Blavier A, Keroack S, Denerolle P, Goy-Thollot I, Chabanne L, Cadore JL y Bourdoiseau G (2001). Atypical forms of canine leishmaniosis. *Vet J*, 162:108-120.
- Boarino A, Scalone A, Gradoni L, Ferroglio E, Vitale F, Zanatta R, Giuffrida MG y Rosati S (2005). Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 12:647-653.
- Boceta C, Alonso C y Jimenez-Ruiz A (2000). Leucine rich repeats are the main epitopes in *Leishmania infantum* PSA during canine and human visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol*, 22: 55-62.
- Boggiatto PM, Gibson-Corley KN, Metz K, Gallup JM, Hostetter JM, Mullin K y Petersen CA (2011). Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. *PLoS Negl Trop Dis*, 5:e1019.
- Boggino J y Maas C (1945). Primer caso autóctono de leishmaniosis visceral. *An Fac Clin Med (Asunción)*, 5:319-326.
- Bourdoiseau G, Hugnet C, Gonçalves RB, Vézilier F, Petit-Didier E, Papierok G, Lemesre JL (2009). Effective humoral and cellular immunoprotective responses in Li ESAp-MDP vaccinated protected dogs. *Vet Immunol Immunopathol*, 15;128(1-3):71-78.
- Borja-Cabrera GP, Correia NN, da Silva VO, de Souza E, Santos WR, Gomes EM, Luz KG, Palatnik M y Palatnik de Sousa CB (2002). Long lasting protection against canine kala-azar using the FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amarante, RN). *Vaccine*, 20:3277-3284.
- Borja-Cabrera GP, Cruz A., de Souza E., Hashimoto LY, de ATFA, Kawasaki JK, Costa AC, Reis AB, Genaro O, Batista LM, Palatnik My Palatnik-de-Sousa CB (2004). Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine*, 22:2234-2243.
- Borzzone RA (1926). Leishmaniosis tegumentaria americana vegetante con localizaciones viscerales. *Bol Inst Clin Quirurg Bs As*, 13:322-326.
- Botilde Y, Laurent T, Tintaya WQ, Chicharro C, Cañavate C, Cruz I, Kuhls K, Schönian G y Dujardin JC (2006). Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. *Infect Gen and Evolution*, 6:440-446.

- Bourdeau P y Groulade P (1988). Results of an inquiry into leishmaniasis. *Prat Med Chirur Anim Comp*, 23:5-10.
- Brandonisio O, Carelli G, Ceci L, Consenti B, Fasanella A y Puccini V (1992). Canine leishmaniasis in the Gargano promontory (Apulia, South Italy). *Eur J Epidemiol*, 8:273-276.
- Brasil Ministério da Saúde (2006). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasil Ministério da Saúde, Brasília, Brasil. 182 págs.
- Bray RS (1985). Immunodiagnosis of leishmaniasis. En: Leishmaniasis. Chang KP y Bray RS (Edit). Elsevier, Amsterdam, Holanda. Págs 177-182.
- Brodie TM, Smith MC, Morris RV y Titus RG (2007). Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages. *Infect Immun*, 75(5):2359-2365.
- Brooker S y Utzinger J (2007). Integrated disease mapping in a polyparasitic world. *Geospat Health* 1:141-146.
- Burns JM, Shreffler WQG, Benson DR, Ghalib H W, Badaro R y Reed SG (1993). Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:775-779.
- Cabral M, O'Grady J y Alexander J (1992). Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol*, 14:531-539.
- Cabral M, O'Grady JE, Gomes S, Sousa JC, Thompson H y Alexander J (1998). The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet Parasitol*, 76(3):173-180.
- Cabrera MA, Paula AA, Camacho LA, Marzochi MC, Xavier SC, da Silva AV y Jansen AM (2003). Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 45:79-83.
- Calvopina M, Uezato H, Gomez EA, Korenaga M, Nonaka S y Hashiguchi Y (2006). Leishmaniasis recidiva cutis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in subtropical Ecuador: isoenzymatic characterization. *Int J Dermatol*, 45:116-120.
- Canese A (2000). Leishmaniosis visceral canina en el área metropolitana de la "Gran Asunción", Paraguay. *Medicina (Buenos Aires)*, 60(III):65.
- Camargo-Neves VLF, Katzg DE, Rodas LAC, Poletto DW, Lage LC, Spnola RMF y Cruz OG (2001). Uso de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica da leishmaniose visceral americana, Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. *Cad Saúde Pública*, 17 (5):1263-1267.

- Camargo ME y Rebonato C (1969). Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. *Am J Trop Med Hyg*, 18:500-505.
- Campanini A, Sinagra A, Saravia N, Arévalo J, Luna C, Sosa Estani S, Salomón D y Segura EL (1993). Caracterización in vitro de aislados de *Leishmania* de pacientes de Salta. *Medicina (Buenos Aires)*, 53(1):81.
- Campino L, Santos-Gomes G, Rica MJ, Cortes S y Abranches P (2000). Infectivity of promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* in a canine model for leishmaniosis. *Vet Parasitol*, 92:269-275.
- Campos-Ponce M, Ponce C, Ponce E, Maingon RD (2005). *Leishmania chagasi/infantum*: further investigations on *Leishmania* tropisms in atypical cutaneous and visceral leishmaniasis foci in Central America. *Exp Parasitol*, 109(4):209-219.
- Cardoso L, Neto F, Sousa JC, Rodrigues M y Cabral M (1998). Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Vet Parasitol*, 79:213-220.
- Cardoso L, Schallig HD, Neto F, Kroon N y Rodrigues M (2004). Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Regua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Trop*, 91:95-100.
- Carrillo J, Chinchilla M, Valverde B, Porrás O y Mora L (1999). Visceral leishmaniasis in Costa Rica: first case report. *Clin Infect Dis*, 29(3):678-679.
- Carvalho EM, Bacellar O, Barral A, Badaro R y Johnson WD Jr (1989). Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. *J Clin Invest*, 83(3):860-864.
- Carvalho FA, Charest H, Tavares CA, Matlashewski G, Valente EP, Rabello A, Gazzinelli RT y Fernandes AP (2002). Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. *Infect Immun*, 70(12):6734-6740.
- Carvalho SF, Lemos EM, Corey R y Dietze R (2003). Performance of recombinant [39K] antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 68:321-324.
- Cavalier-Smith T (1998). A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 73:203-266.
- Chang PCH (1956). The ultrastructure of *Leishmania donovani*. *J Parasitol*, 42:126-136.

- Chappuis F, Rijal S, Soto A, Menten J y Boelaert M (2006). A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ*, 333:723.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J y Boelaert M (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*, 5:873-882.
- Chargui N, Amro A, Haouas N, Schönian G, Babba H, Schmidt S, Ravel C, Lefebvre M, Bastien P, Chaker E, Aoun K, Zribi M y Kuhls K (2009). Population structure of Tunisian *Leishmania infantum* and evidence for the existence of hybrids and gene flow between genetically different populations. *Int J Parasitol*, 39:801-811.
- Chicharro C, Morales MA, Serra T, Ares M, Salas A y Alvar J (2002). Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca: a comparison of phenotypic and genotypic tools. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 96(Suppl. 1):S93-S99.
- Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A y Persechino A (1997). A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec*, 141:539-543.
- Ciaramella P y Corona M (2003). Canine leishmaniasis: therapeutic aspects. En: Continuing Education for the Practicing Veterinarian, 5:370-375.
- Ciaramella P, Pelagalli A, Cortese L, Pero ME, Corona M, Lombardi P, Avallone L y Persechino A (2005). Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet J*, 169:465-467.
- Convit J, Ulrich M, Aranzazu N, Castellanos PL, Pinardi ME y Reyes O (1986). The development of a vaccination model using two microorganisms and its application in leprosy and leishmaniasis. *Lepr Rev*, 57(2):263-273.
- Convit J, Ulrich M, Fernández CT, Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Castés M y Rondón AJ (1993). The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 87(4):444-448.
- Corredor A, Gallego J, Tesh RB, Morales A, Ferro C, Young D G, Kreutzer R D, Boshell J, Palau M T, Cáceres E y Peláez D (1989). Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. *Am J Trop Med Hyg*, 5:480-486.
- Cortés S, Rolao N, Ramada J y Campino L (2004). PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 98:12-17.
- Cortés S, Maurício I, Almeida A, Cristovaño J M, Pratlong F, Dedet JP y Campino L (2006). Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. *Parasitol Int*, 55:277-283.

- Cortés LA y Fernández JJ (2008). Especies de *Lutzomyia* en un foco urbano de leishmaniasis visceral y cutánea en El Carmen de Bolívar, Bolívar, Colombia. *Biomedica*, 28(3):433-440.
- Cortes S, Chicharro C, Cruz I, Cristovaño JM, Canavate C y Campino L (2010). Genetic Diversity of Human Zoonotic Leishmaniasis in Iberian Peninsula. *Zoonoses and Public Health*, 58:234-237.
- Costa CH, Pereira HF y Araujo MV (1990) Epidemia de leishmaniose visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. *Rev Saude Publica*, 24:361-372.
- Costa CH Tapety CM y Werneck GL (2007). Control of visceral leishmaniasis in urban areas: randomized factorial intervention trial. *Rev Soc Bras Med Trop*, 40:415-419.
- Costa CH (2008). Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saúde Pública*, 24:2959-2963.
- Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez LM, Shaw JJ y Dye C (2002). Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis*, 186:1314-1320.
- Cousiño B (2006). En: Vigilancia y Control de la Leishmaniasis en el Paraguay. Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas, Panaftosa, Rio de Janeiro, Brazil Organización Panamericana de la Salud. Págs. 34-36.
- Coutinho-Abreu IV y Ramalho-Ortigao M (2010). Transmission blocking vaccines to control insect-borne diseases: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 105(1):1-12.
- Coutinho MT, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, De María M, Genaro O y Linardi PM (2005). Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 128:149-155.
- Coutinho MT y Linardi PM (2007). Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? *Vet Parasitol*, 147:320-325.
- Cruz I, Morales MA, Nogueira I, Rodríguez A y Alvar J (2002a). *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet*, 359:1124-1125.
- Cruz I, Cañavate C, Rubio JM, Morales MA, Chicharro C, Laguna F, Jiménez-Mejías M, Sirera G, Videla S y Alvar J (2002b). A nested polymerase chain reaction (Ln-PCR) for diagnosing and monitoring *Leishmania infantum* infection in patients co-infected with human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 96(1):S185-189.
- Cruz I, Chicharro C, Nieto J, Bailo B, Cañavate C, Figueras MC y Alvar J (2006). Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 44:2343-2347.

- da Costa RT, França JC, Mayrink W, Nascimento E, Genaro O y Campos-Neto A (2003). Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens rK39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 97:678-682.
- da Costa-Val AP, Cavalcanti RR, de Figueiredo Gontijo N, Michalick MS, Alexander B, Williams P y Melo MN (2007). Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Vet J*, 174:636-643.
- Dantas-Torres F y Brandão-Filho SP (2006). Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 48(3): 151-156.
- Dantas-Torres F (2007). The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol*, 149:139-146.
- Dantas-Torres F (2009). Canine leishmaniosis in South America. *Parasit Vectors*, 26:S1.
- Darce M, Moran J, Palacios X, Belli A, Gomez-Urcuyo F, Zamora D, Valle S, Gantier JC, Momen H y Grimaldi G Jr (1991). Etiology of human cutaneous leishmaniasis in Etiology of human cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 85(1):58-59.
- da Silva VO, Borja-Cabrera GP, Correia NN, de Souza EP, Luz KG, Palatnik M y Palatnik de Sousa CB (2000). A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amaranto, RN). *Vaccine*, 19:1082-1092.
- da Silva ES, van der Meide WF, Schoone GJ, Gontijo CM, Schallig HD, Brazil RP (2006). Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Vet Res Commun*, 30(6):637-643.
- da Silva SM, Ribeiro VM, Ribeiro RR, Tafuri WL, Melo MN y Michalick MSM (2009). First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. *Vet Parasitol*, 166:159-162.
- Davies CR, Kaye P, Croft SL y Sundar S (2003). Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ*. 326(7385):377-382.
- de Andrade HM, Reis AB, dos Santos SL, Volpini AC, Marques MJ y Romanha AJ (2006). Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet Parasitol*, 140:231-238.
- Dedet JP, Pratlong F, Lanotte G y Ravel C (1999). Cutaneous Leishmaniasis. The parasite. *Clin Dermatol*, 17:261-268.

- de Freitas E, Melo MN, da Costa-Val AP y Michalick MS (2006). Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol* 137(1-2):159-167.
- de Leon JR y Figueroa LN (1959). Descubrimiento del primer foco endémico de kala-azar en Guatemala y sus condiciones epidemiológicas. *Rev Col Med Guatem*, 10:240-245.
- Delgado O, Feliciangeli MD, Coraspe V, Silva S, Perez A y Arias J (2001). Value of a dipstick based on recombinant RK39 antigen for differential diagnosis of American visceral leishmaniasis from other sympatric endemic diseases in Venezuela. *Parasite*, 8(4):355-357.
- de Lima H, Rodriguez N, Feliciangeli MD, Barrios MA, Sosa A, Agrela I, Sánchez E y Lopez O (2009). Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania chagasi/L. infantum* in an endemic area of Guarico State, Venezuela. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 103:721-726.
- de Lima VM, Ikeda FA, Rossi CN, Feitosa MM, Vasconcelos RO, Nunes CM y Goto H (2010). Diminished CD4+/CD25+ T cell and increased IFN-gamma levels occur in dogs vaccinated with Leishmune in an endemic area for visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 135:296-302.
- Denerolle P y Bourdoiseau G (1999). Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). *J Vet Intern Med*, 13(5):413-415.
- de Oliveira SS y de Araújo TM (2003). Avaliação das ações de controle da leishmaniose visceral (calazar) em uma área endêmica do Estado da Bahia, Brasil (1995-2000). *Cad Saúde Pública*, 19:1681-1690.
- de Oliveira C, de Souza EP, Borja-Cabrera GP, Melo ML, dos Santos MA, Parra LE, Menz I, Palatnik M y Palatnik de Sousa CB (2003). IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 21:2589-2597.
- de Paula CC, Figueiredo FB, Menezes RC, Mouta-Confort E, Bogio A y Madeira Mde F (2009). Leishmaniose visceral canina em Maricá, Estado do Rio de Janeiro: relato do primeiro caso autóctone. *Rev Soc Bras Med Trop*, 42(1):77-78.
- de Souza VMM, Julião FS, Neves RCS, Magalhães PB, Bisinotto TV, Lima AS, de Oliveira SS y Júnior EDM (2008). Community assay for assessment of effectiveness of strategies for prevention and control of human visceral leishmaniasis in the municipality of Feira de Santana, State of Bahia, Brazil. *Epidemiol Serv Saude*, 17:97-106.
- Dereure J, Rioux JA, Gállego M, Perieres J, Pratlong F, Mahjour J y Saddiki H (1991). *Leishmania tropica* in Morocco: infection in dogs. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 85:595.

- Desjeux P, Aranda E, Aliaga O y Mollinedo S (1983). Human visceral leishmaniasis in Bolivia: first proven autochthonous case from 'Los Yungas'. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77(6):851-852.
- Desjeux P (1996). Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol*, 14:417-423.
- Desjeux P (2001). The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 95:239-243.
- Desjeux P (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 27:305-318.
- Dietze R, Falqueto A, Valli LC, Rodrigues TP, Boulos M y Corey R (1995). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis with a dot-enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg*, 53:40-42.
- Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A y Corey R (1997). Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis*, 25:1240-1242.
- di Lorenzo C y Proietti FA (2002). Leishmaniose visceral canina como fator de risco para a leishmaniose visceral humana: o que sabemos e o que não sabemos ainda. *Rev Soc Bra Med Trop*, 35 (III):75-81.
- Dimier-David L, Inofuentes A, Carrasco M, David C, Vargas F, Revollo S y Dedet JP (1991). A new case of autochthonous visceral leishmaniasis in Bolivia. *Ann Soc Belg Med Trop*, 71(4):275-278.
- Diniz SA, Melo MS, Borges AM, Bueno R, Reis BP, Tafuri WL, Nascimento EF y Santos RL (2005). Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Vet Pathol*, 42(5):650-658.
- Diniz SA, Silva FL, Carvalho Neta AV, Bueno R, Guerra R MSNC, Abreu-Silva AL y Santos RL (2008). Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. *J Infect Developing Countries*, 2:24-33.
- dos Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, de Paiva Hoffmann M, de Freitas RA y Malacco MA (1998). Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol*, 12(3):315-317.
- dos-Santos WL, David J, Badaro R y de-Freitas LA (2004). Association between skin parasitism and a granulomatous inflammatory pattern in canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res*, 92:89-94.
- dos-Santos WL, Jesus EE, Paranhos-Silva M, Pereira AM, Santos JC, Baleeiro CO, Nascimento EG, Moreira ED, Oliveira GG y Pontes-de-Carvalho LC (2008). Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in

- canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. *Vet Immunol Immunopathol*, 123:251-259.
- Dowlati Y (1996). Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect. *Clin Dermatol*, 14(5):425-431.
- Drumond KO y Costa FAL (2011). Forty years of visceral Leishmaniasis in the state of Piauí: A review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 53(1):3-11.
- Duarte Z, Munguia J, Orozco M y Gantier JC (1994). First report of visceral leishmaniasis in Nicaragua. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88(1):38.
- Duprey ZH, Steurer FJ, Rooney JA, Kirchhoff LV, Jackson JE, Rowton ED y Schantz PM (2006). Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerg Infect Dis*, 12:440-446.
- Duret JP (1952). Notas de Flebotomos Argentinos. *Rev Sanid Milit Argent*, 51(4):534-536.
- Dye C (1996). The logic of visceral leishmaniasis control. *Am J Trop Med Hyg*, 55:125-130.
- el Harith A, Slappendel RJ, Reiter I, van Knapen F, de Korte P, Huigen E y Kolk AH (1989). Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-*Leishmania* antibodies in the canine reservoir. *J Clin Microbiol*, 27(10):2252-2257.
- Englund PT (1981). Kinetoplast DNA. En: Levandowsky M y Hunter SH (Edits), *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, vol. 4, 2ª Edición, Academic Press, New York. Págs 333-383.
- Evans TG, Krug EC, Wilson ME, Vasconcelos AW, de Alencar JE y Pearson RD (1989). Evaluation of antibody responses in American visceral leishmaniasis by ELISA and immunoblot. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 84(2):157-166.
- Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Vasconcelos I de AB, Vasconcelos AW, Sousa A de Q, de Oliveira JW y Pearson RD (1992). Epidemiology of visceral leishmaniasis in Northeast Brazil. *J Infect Dis* 166(5):1124-1132.
- Fallah E, Mohebbali M y Zareh NH (2000). Preparation and evaluation of *Leishmania* vaccines in Iran for the control of kala-azar. *Acta Parasitol*, 45:202-203.
- Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodríguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sánchez A y Roura X (2006). Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 137(3-4):214-221.
- Feliciangeli MD, Delgado O, Suarez B y Chiurillo MA (2005). The burden of the *Leishmania chagasi/infantum* infection in a closed rural focus of visceral

- leishmaniasis in Lara state, west-central Venezuela. *Trop Med Int Health* 10(5):444-449.
- Feliciangeli MD, Delgado O, Suarez B y Bravo A (2006). *Leishmania* and sand flies: proximity to woodland as a risk factor for infection in a rural focus of visceral leishmaniasis in west central Venezuela. *Trop Med Int Health*, 11(12):1785-1791.
- Fernandes AP, Costa MM, Coelho EA, Michalick MS, de Freitas E, Melo MN, Luiz Tafuri W, Resende Dde M, Hermont V, Abrantes Cde F y Gazzinelli RT (2008). Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*, 26(46):5588-5595.
- Fernández J, Bello F, López MC, Moncada LI, Vargas JJ, Ayala MS, Nicholls RS y Lozano CA (2006). Seroprevalencia de leishmaniosis visceral canina en el sector 8 de Neiva y en 4 municipalidades de Huila, Colombia. *Biomedica*, 26(1):121-130.
- Fernández-Bellón H, Solano-Gallego L, Bardagi M, Alberola J, Ramis A y Ferrer L (2006). Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Vet Parasitol*, 135:181-185.
- Fernández E (1941). Un caso de leishmaniosis visceral autóctona. *El Diario Médico* 41:14.
- Fernández MS, Salomon OD, Cavia R, Perez AA, Acardi SA y Guccione JD (2010). *Lutzomyia longipalpis* spatial distribution and association with environmental variables in an urban focus of visceral leishmaniasis, Misiones, Argentina. *Acta Trop*, 114:81-87.
- Fernández MS, Lestani EA, Cavia R y Salomón OD (2012). Phlebotominae fauna in a recent deforested area with American tegumentary leishmaniasis transmission (Puerto Iguazú, Misiones, Argentina): seasonal distribution in domestic and peridomestic environments. *Acta Trop*, 122(1):16-23.
- Fernández-Pérez FJ, Méndez S, de la Fuente C, Gómez-Muñoz MT, Cuquerella M y Alunda JM (1999). Short report: improved diagnosis and follow-up of canine leishmaniasis using amastigote-based indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg*, 61(4):652-653.
- Ferrer L (1999). Clinical aspect of canine leishmaniasis. En: Canine leishmaniasis: an update. Proceedings of the International Canine Leishmaniosis Forum Barcelona, págs 6-10.
- Ferreira Ede C, de Lana M, Carneiro M, Reis AB, Paes DV, da Silva ES, Schallig H y Gontijo CM (2007). Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet Parasitol*, 146(3-4):235-241.

- Ferreira MG, Fattori KR, Souza F y Lima VM (2009). Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. *Vet Parasitol*, 165:150-154.
- Ferroglio E, Romano A, Trisciuglio A, Poggi M, Ghiggi E, Sacchi P y Biglino A (2006). Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 100:636-641.
- Ferroglio E, Poggi M y Trisciuglio A (2008). Evaluation of 65% permethrin spot-on and deltamethrin impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. *Zoonoses Public Health*, 55:145-148.
- Fisa R, Gállego M, Riera C, Aisa MJ, Valls D, Serra T, de Colmenares M, Castillejo S y Portús M (1997). Serologic diagnosis of canine leishmaniasis by dot-ELISA. *J Vet Diagn Invest*, 9(1):50-55.
- Fisa R, Gállego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, Carrió J, Gállego J y Portús M (1999). Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. *Vet Parasitol*, 83:87-97.
- Fisa R, Riera C, Gállego M, Manubens J y Portús M (2001). Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet Parasitol*, 99:105-111.
- Fondevila D, Vilafranca M y Ferrer L (1997). Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 56:319-327.
- Fonso C e Ink J (1947). Estudio clínico experimental sobre un caso de leishmaniasis visceral. *Rev med y Cienc Af*, 93-95:36-43.
- Font A, Ginés C, Closa JM y Mascort J (1994). Visceral leishmaniasis and disseminated intravascular coagulation in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, 204:1043-1044.
- Font A, Roura X, Fondevila D, Closa JM, Mascort J y Ferrer L (1996). Canine mucosal leishmaniasis. *J Am Anim Hosp Assoc*, 32:131-137.
- França-Silva JC, Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GLL, Costa CA, Mayrink W, Vieira EP, Costa JS, Genaro O y Nascimento E (2003). Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol*, 111:161-173.
- Franceschi A, Merildi V, Guidi G y Mancianti F (2007). Occurrence of *Leishmania* DNA in urines of dogs naturally infected with leishmaniasis. *Vet Res Commun*, 31(3):335-341.
- Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodríguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sánchez A y Roura X (2006). Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 137:214-221.

- Franke CR, Ziller M, Staubach C y Latif M (2002). Impact of the El Niño/Southern Oscillation on visceral leishmaniasis, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 8:914-917.
- Gaeta GB, Gradoni L, Gramiccia M, di Martino L, Pizzuti R, Pempinello R, Scotti S y Maisto A (1994). Visceral leishmaniasis in Italy. Its epidemiology, clinical picture and therapy. *Recenti Prog Med*, 85:340-347.
- Galindo I y Ramírez JL (1989). Study of *Leishmania mexicana* electrokaryotype by clamped homogeneous electric field electrophoresis. *Mol Biochem*, 34(3):245-252.
- Gálvez R, Miró G, Descalzo MA, Nieto J, Dado D, Martín O, Cubero E y Molina R, (2010), Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniosis in the Madrid region (central Spain). *Vet Parasitol*, 169:327-334.
- Gao G, Kapushoc ST, Simpson AM, Thiemann OH y Simpson L (2001). Guide RNAs of the recently isolated LEM125 strain of *Leishmania tarentolae*: an unexpected complexity. *RNA*, 7:1335-1347.
- García-Alonso M, Nieto CG, Blanco A, Requena JM, Alonso C y Navarrete I (1996a). Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. *Parasite Immunol*, 18:539-546.
- García-Alonso M, Blanco A, Reina D, Serrano FJ, Alonso C y Nieto CG (1996b). Immunopathology of the uveitis in canine leishmaniasis. *Parasite Immunol*, 18:617-623.
- García AL, Parrado R, Rojas E, Delgado R, Dujardin JC y Reithinger R (2009). Leishmaniasis in Bolivia: comprehensive review and current status. *Am J Trop Med Hyg*, 80(5):704-711.
- Gavvani AS, Hodjati MH, Mohite H y Davies CR (2002). Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. *Lancet*, 360(9330):374-379.
- Gibson-Corley KN, Hostetter JM, Hostetter SJ, Mullin K, Ramer-Tait AE, Boggiatto PM y Petersen CA (2008). Disseminated *Leishmania infantum* infection in two sibling foxhounds due to possible vertical transmission. *Can Vet J*, 49(10):1005-1008.
- Ginel PJ, Lucena R, López R y Molleda JM (1998). Use of allopurinol for maintenance of remission in dogs with leishmaniasis. *J Small Anim Pract*, 39(6):271-274.
- Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Correa-Oliveira R, Martins-Filho A, Marques MJ, Tafuri WL y Reis AB (2006). Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Pathol*, 135:100-107.
- Giunchetti RC, Mayrink W, Carneiro CM, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Marques MJ, Tafuri WL y Reis AB (2008). Histopathological and immunohistochemical

- investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci*, 84:269-277.
- Gomes YM, Paiva Cavalcanti M, Lira RA, Abath FG y Alves LC (2008). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J*, 175(1):45-52.
- Gómez-Ochoa P, Castillo JA, Lucientes J, Gascón M, Zarate JJ, Arbea JI, Larraga V y Rodríguez C (2003). Modified direct agglutination test for simplified serologic diagnosis of leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 10(5):967-968.
- González G, Rodríguez C y Simón A (1976). Morfología de la *Leishmania trópica* en su estado intracelular en la dermis humana. *Actas Dermo-Sif*, 67:527-534.
- Goto H y Prianti MG (2009). Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 51:241-246.
- Gobierno de la Provincia de Misiones:
(http://www.misiones.gov.ar/index.php?option=com_frontpage&Itemid=1;
<http://posadas.gov.ar/es/caracteristicas/poblacion>).
- Gradoni L, Maroli M, Gramiccia M y Mancianti F (1987). *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. *Med Vet Entomol*, 1:339-342.
- Gradoni L y Gramiccia M (2000). Leishmaniasis. En: OIE manual of standards for diagnostic tests and vaccine. 4th ed. Office International des Epizootis, Paris. Págs 803-812.
- Gradoni L (2002). The diagnosis of canine leishmaniasis. Canine Leishmaniasis: moving towards a solution. En: Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum. Intervet International (Edit), Sevilla, España. Págs 7-14.
- Gradoni L, Foglia Manzillo V, Pagano A, Piantedosi D, De Luna R, Gramiccia M, Scalone A, Di Muccio T y Oliva G (2005). Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine*, 23:5245-5251.
- Gramiccia M y Gradoni L (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol*, 35:1169-1180.
- Grimaldi G Jr, Tesh RB y McMahon-Pratt D (1989). A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg*, 41(6):687-725.
- Grimaldi G Jr, y Tesh RB (1993). Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev*, 6:230-250.
- Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, Peribáñez MA, Alvar J y Castillo JA, (2000). Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally

- infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Res Vet Sci*, 69:249-253.
- Guerin PJ, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft SL, Desjeux P, Wasunna MK y Bryceson AD (2002). Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis*, 2:494-501.
- Guizani IG, Van Eys JJM, Riadh BI y Koussay D (1994). Use of recombinant DNA probes for species identification of old world *Leishmania* isolates. *Am J Trop Med Hyg*, 50:632-640.
- Gurunathan S, Stobie L, Prussin C, Sacks DL, Glaichenhaus N, Iwasaki A, Fowell DJ, Locksley RM, Chang JT, Wu CY y Seder RA (2000). Requirements for the maintenance of Th1 immunity in vivo following DNA vaccination: a potential immunoregulatory role for CD8+ T cells. *J Immunol*, 165:915-924.
- Halbig P, Hodjati MH, Mazloumi-Gavvani AS, Mohite H y Davies CR (2000). Further evidence that deltamethrin-impregnated collars protect domestic dogs from sandfly bites. *Med Vet Entomol*, 14(2):223-226.
- Hassan MM, Osman OF, El-Raba'a FM, Schallig HD y Elnaiem DE (2009). Role of the domestic dog as a reservoir host of *Leishmania donovani* in eastern Sudan. *Parasit Vectors*, 2:26.
- Hepburn NC (2003). Cutaneous leishmaniasis: an overview. *J Postgrad Med*, 49(1):50-54.
- Hervás J, Méndez A, Carrasco L y Gómez-Villamandos JC (1996). Pathological study of visceral leishmaniasis in a jackal (*Canis aureus*). *Vet Rec*, 139(12):293-295.
- Herwaldt BL (1999). Leishmaniasis. *Lancet*, 354:1191-1199.
- Holzmuller, P. Bras-Gonçalves R y Lemesre JL (2006). Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. *Parasitology*, 132:S19-S32.
- Hotez PJ, Bottazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK y Periago MR (2008). The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis*, 2(9):e300.
- Inda FF, Vivoli D y Vacarezza AJ (1934): Estudio anatómico-clínico de un caso de kala-azar en el adulto (fiebre negra). Primera observación en nuestro país. *La semana Médica*, 413-424.
- Jelinek T, Eichenlaub S, y Lošcher T (1999). Sensitivity and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 18:669-670.

- Jeronimo SM, Teixeira MJ, Sousa AD, Thielking P, Pearson RD y Evans TG (2000). Natural history of *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection in Northeastern Brazil: long-term follow-up. *Clin Inf Dis*, 30:608-609.
- Jüttner C, Rodríguez Sánchez M, Rollán Landeras E, Slappendel RJ y Fragío Arnold C (2001). Evaluation of the potential causes of epistaxis in dogs with natural visceral leishmaniasis. *Vet Rec*, 149(6):176-179.
- Kalra NL y Bang YH (1988). Manual on entomology in visceral leishmaniasis, World Health Organization, Nueva Delhi, 88 págs.
- Killick-Kendrick R (1985). Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between Leishmaniae and their phlebotomine vectors. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*, 78:747-755.
- Killick-Kendrick R, Killick-Kendrick M, Focheux C, Dereure J, Puech MP y Cadiergues MC (1997). Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med Vet Entomol*, 11:105-111.
- Killick-Kendrick R (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol*, 7(3):279-289.
- Kishore K, Kumar V, Kesari S, Dinesh DS, Kumar AJ, Das P y Bhattacharya SK (2006). Vector control in leishmaniasis. *Indian J Med Res*, 123:467-472.
- Kjos SA, Snowden KF, Craig TM, Lewis B, Ronald N y Olson JK (2008). Distribution and characterization of canine Chagas disease in Texas. *Vet Parasitol*, 152:249-256.
- Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides L, Polizopoulou Z, Billinis C, Argyriadis D, Diakou N y Papadopoulos O (2001). A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 98:247-261.
- Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GE, Mauricio IL, Oddone R, Feliciangeli MD, Wirth T, Miles MA y Schönian G (2011). Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(6):e1155.
- Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP y Bastien P (2002). Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 40:210-215.
- Lage RS, Oliveira GC, Busek SU, Guerra LL, Giunchetti RC, Correa-Oliveira R y Reis AB (2007). Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*, 115:135-145.

- Lainson R y Rangel EF (2005). *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100(8):811-827.
- Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT y Braga RR (1987). American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 81(3):517.
- Lainson R y Shaw JJ (1987). Evolution, classification and geographical distribution. En: The leishmaniasis in biology and medicine. Academic Press. Peters W y Killick-Kendrick R (Edit), Londres. 120 págs.
- Lainson R y Shaw JJ (2005). New World Leishmaniasis. En: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 10th ed. Cox FEG, Wakelin D, Gillespie SH y Despommier DD (Edit), Londres: Wiley & Blackwell. Págs 313-349.
- Lamothe J (2001). Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. *J Small Anim Pract*, 42(4):170-175.
- Lanotte G, Rioux JA, Perieres J y Vollhardt Y (1979). Ecology of leishmaniasis in the south of France. 10. Developmental stages and clinical characterization of canine leishmaniasis in relation to epidemiology. *Ann Parasitol Hum Comp*, 54(3):277-295.
- Lanzaro GC, Ostrovska K, Herrero MV, Lawyer PG y Warburg A (1993). *Lutzomyia longipalpis* is a species complex: genetic divergence and interspecific hybrid sterility among three populations. *Am J Trop Med Hyg*, 48(6):839-847.
- le Fichoux Y, Quaranta JF, Aufeuve JP, Lelievre A, Marty P, Suffia I, Rousseau D y Kubar J (1999). Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. *J Clin Microbiol*, 37:1953-1957.
- Lemesre JL (1993). Patent Application number FR 2 705 358 – A1. Procédé de culture in vitro de différents stades de parasites tissulaires obtenus et applications biologiques.
- Lemesre JL, Holzmüller P, Cavaleyra M, Gonçalves RB, Hottin G y Papierok G (2005). Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. *Vaccine*, 23:2825-2840.
- Lemesre JL, Holzmüller P, Gonçalves RB, Bourdoiseau G, Hugnet C, Cavaleyra M y Papierok G (2007). Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine*, 25(21):4223-4234.
- Lemos EM, Laurenti MD, Batistela Moreira MA, Barbosa Reis A, Cordeiro Giunchetti R, Raychaudhuri S y Dietze R (2008). Canine visceral leishmaniasis: performance

of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect™) on dogs with and without signs of the disease. *Acta Trop*, 107:205-207.

Lemrani M, Nejjar R y Pratlong F (2002). A new *Leishmania tropica* zymodeme--causative agent of canine visceral leishmaniasis in northern Morocco. *Ann Trop Med Parasitol*. 96(6):637-638.

Leontides LS, Saridomichelakis MN, Billinis C, Kontos V, Koutinas AF, Galatos AD y Mylonakis ME (2002). A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet Parasitol*, 109(1-2):19-27.

Liese J, Schleicher U y Bogdan C (2008). The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology*, 213(3-4):377-87.

Lighthall GK y Giannini SH (1992). The chromosomes of *Leishmania*. *Parasitol Today*, 8(6):192-199.

Lima NM, Correia CS, Leon LL, Machado GM, Madeira Mde F, Santana AE y Goulart MO (2004). Antileishmanial activity of lapachol analogues. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99(7):757-761.

Llanos-Cuentas EA, Roncal N, Villaseca P, Paz L, Ogusuku E, Pérez JE, Cáceres A y Davies CR (1999). Natural infections of *Leishmania peruviana* in animals in the Peruvian Andes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 93(1):15-20.

Lobsiger L, Muller N, Schweizer T, Frey CF, Wiederkehr D, Zumkehr B y Gottstein B (2010). An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. *Vet Parasitol*, 169:408-414.

Lopez R, Lucena R, Novales M, Ginel PJ, Martin E y Molleda JM (1996). Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *Zentralbl Veterinarmed B*, 43(8):469-474.

Lukes J, Mauricio IL, Schönián G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, Kuhls K, Tintaya KW, Jirků M, Chocholová E, Haralambous C, Pratlong F, Oborník M, Horák A, Ayala FJ y Miles MA (2007). Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(22):9375-9380.

Machado P, Araújo C, Da Silva AT, Almeida RP, D'Oliveira Jr A, Bittencourt A y Carvalho EM (2002). Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clin Infect Dis*, 34(12):e69-73.

Maizels RM, Blaxter ML, Robertson BD y Selkirk, ME (1991). Parasite Antigens, Parasite Genes. A Laboratory Manual for Molecular Parasitology. Cambridge University Press, 224 págs.

Madeira MF, Schubach A, Schubach TM, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA, Figueiredo FB, Baptista C y Marzochi MC (2006). Mixed infection with

- Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2006;100(5):442-445.
- Magalhães PA, Mayrink W, Costa CA, Melo MN, Dias M, Batista SM, Michalick MSM y Williams P (1980). Calazar na zona do Rio Doce-Minas Gerais. Resultados de medidas profiláticas. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 22:197-202.
- Magill AJ (2005). Cutaneous leishmaniasis in the returning traveler. *Infect Dis Clin North Am*, 19(1):241-266.
- Margonari C, Freitas CR, Ribeiro RC, Moura ACM, Timbó M, Gripp AH, Pessanha JP y Dias ES (2006). Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 101:31-38.
- Maia C y Campino L (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol*, 158:274-287.
- Maia C, Ramada J, Cristóvão JM, Gonçalves L y Campino L (2009). Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet J*, 179(1):142-144.
- Maia-Elkhoury AN, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM y Luna EA (2008). Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saúde Pública*, 24(12):2941-2947.
- Mancianti F, Pedonese F y Poli A (1996). Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniasis as compared with indirect immunofluorescence assay. *Vet Parasitol*, 65:1-9.
- Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, Cringoli G, Staiano N y Gravino AE (2004). Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 125(3-4):251-262.
- Manna L, Reale S, Vitale F, Picillo E, Pavone LM y Gravino AE (2008). Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J*, 177(2):279-282.
- Manna L, Vitale F, Reale S, Picillo E, Neglia G, Vescio F y Gravino AE (2008). Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniasis. *Vet J*, 182(3):441-445.
- Manna L, Reale S, Vitale F y Gravino AE (2009). Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res Vet Sci*, 87(1):76-78.
- Marco JD, Barroso PA, Calvopiña M, Kumazawa H, Furuya M, Korenaga M, Cajal SP, Mora MC, Rea MM, Borda CE, Basombrío MA, Taranto NJ y Hashiguchi Y (2005). Species assignment of *Leishmania* from human and canine American

- tegumentary leishmaniasis cases by multilocus enzyme electrophoresis in North Argentina. *Am J Trop Med Hyg*, 72(5):606-611.
- Maroli M, Mizzon V, Siragusa C, D'Oorazi A y Gradoni L (2001). Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Med Vet Entomol*, 15(4):358-363.
- Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L y Gramiccia M (2007). Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*, 145:357-360.
- Martínez MS, Martínez A, Martínez FJ, Martínez F y Hernández S (1990). Epidemiología de la leishmaniosis canina en Córdoba. *Revista Ibérica de Parasitología*, 50:1-7.
- Martínez-Subiela S, Tecles F, Eckersall PD y Cerón JJ (2002). Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet Rec*, 150:241-244.
- Martín-Sánchez J, Navarro-Mari JM, Pasquau-Liaño J, Salomón OD y Morillas-Márquez F (2004). Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in a Spanish patient in Argentina: what is the origin of the infection? Case Report. *BMC Infectious Diseases*, 4:20.
- Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, Pesson B, Marchal O y Morillas-Márquez F (2007). Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet Parasitol*, 145:267-273.
- Martín-Sánchez J, Morales-Yuste M, Acedo-Sánchez C, Barón S, Díaz V y Morillas-Márquez F (2009). Canine leishmaniasis in southeastern Spain. *Emerg Infect Dis*, 15(5):795-798.
- Mateo M (2007). Estudio sobre la eficacia comparada y la tolerancia de la miltefoxina y el antimonio de n-metilglucamina, y la monitorización post tratamiento con alopurinol en la infección natural por *Leishmania infantum* en el perro. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 281 págs.
- Mateo M, Maynard L, Vischer C, Bianciardi P y Miró G (2009). Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniosis. *Parasitol Res*, 105(1):155-162.
- Mauricio IL, Stothard JR y Miles MA (2000). The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today*, 16:188-189.
- Mazza S, y Cornejo J (1926). Primeros casos autóctonos de kala-azar infantil comprobados en el norte de la República. *Bol Inst Clin Quirurg Bs As*, 13:140-144.
- McMahon-Pratt D y Alexander J (2004). Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? *Immunol Rev*, 201:206-224.

- Meinecke CK, Schottelius J, Oskam L y Fleischer B (1999). Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. *Pediatrics*, 104(5):e65.
- Mencke N, Volf P, Volfova V y Stanneck D (2003). Repellent efficacy of a combination containing imidacloprid and permethrin against sand flies (*Phlebotomus papatasi*) in dogs. *Parasitol Res*, 90(3):S108-111.
- Meredith SE, Zijlstra EE, Schoone GJ, Kroon CC, van Eys GJ, Schaeffer KU, el-Hassan AM y Lawyer PG (1993). Development and application of the polymerase chain reaction for the detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical material. *Archives de l'Institut Pasteur de Tunis*, 70:419-431.
- Mettler M, Grimm F, Capelli G, Camp H y Deplazes P (2005). Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, an Immunofluorescent-Antibody Test, and Two Rapid Tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania* Infections in Dogs. *J of Clinical Microbiology*, 43:5515-5519.
- Michalsky EM, Rocha MF, da Rocha Lima AC, França-Silva JC, Pires MQ, Oliveira FS, Pacheco RS, dos Santos SL, Barata RA, Romanha AJ, Fortes-Dias CL y Dias ES (2007). Infectivity of seropositive dogs, showing diferente clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol*, 147:67-76.
- Michalsky EM, França-Silva JC, Barata RA, Lara e Silva F de O, Loureiro AM, Fortes-Dias CL y Dias ES (2009). Phlebotominae distribution in Janaúba, an area of transmission for visceral leishmaniasis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104: 56-61.
- Migone LE (1913). Un caso de kala-azar a Asunción, Paraguay. *Bull Soc Pathol Exot*, 6:118-120.
- Miranda S, Roura X, Picado A, Ferrer L y Ramis A (2008). Characterization of sex, age and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Res Vet Sci*, 85:35-38.
- Miró G, Montoya A, Mateo M, Alonso A, Garcia S, Garcia A, Caballero MJ y Molina R (2007a). A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996–2006). *Parasitol Res*, 101:253-257.
- Miró G, Gálvez R, Mateo M, Montoya A, Descalzo MA y Molina R (2007b). Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Vet Parasitol*, 143(3-4):375-379.
- Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G y Baneth G (2008). Canine leishmaniosis new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol*, 24:371-377.

- Miró G, Oliva G, Cruz I, Cañavate C, Mortarino M, Vischer C y Bianciardi P (2009). Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. *Vet Dermatol*, 20(5-6):397-404.
- Mohebbali M., Fallah E., Jamshidi S. y Hajjaran H (1998). Vaccine trial against canine visceral leishmaniasis in the Islamic Republic of Iran. *East Mediterr Health J*, 4:234-238.
- Mohebbali M, Taran M y Zarei Z (2004). Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick (39rK) test and direct agglutination. *Vet Parasitol*, 121:239-245.
- Molano I, Alonso MG, Miron C, Redondo E, Requena JM, Soto M, Nieto CG y Alonso C (2003). A *Leishmania infantum* multi-component antigenic protein mixed with live BCG confers protection to dogs experimentally infected with *L. infantum*. *Vet Immunol Immunopathol*, 92:1-13.
- Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA, Lucientes J y Alvar J (1994). Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 88:491-493.
- Molina RL, Moreno J y Nieto J (2001). Evaluation of a topical solution containing 65% permethrin against the sandfly (*Phlebotomus perniciosus*) in dogs. *Vet Therap* 2:261-267.
- Molyneux DH y Ashford RW (1983). The biology of Trypanosoma and Leishmania, parasites of man and domestic animals. International Publications Service (Edit), New York, 294 págs.
- Momen H, Grimaldi G Jr y Deane LM (1987). *Leishmania infantum*, the aetiological agent of American visceral leishmaniasis (AVL)? *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 82:447-448.
- Moraes-Silva E, Rodrigues Antunes F, Silva Rodrigues M, da Silva Julião F, Gomes Dias-Lima A, Lemosde-Sousa V, Costa de Alcantara A, Almeida Gomes Reis E, Nakatani M, Badaró R, Galvão Reis M, Pontes-de-Carvalho L y Roberto Franke C (2006). Domestic swine in a visceral leishmaniasis endemic area produce antibodies against multiple *Leishmania infantum* antigens but apparently resist to *L. infantum* infection. *Acta Trop*, 98:176-182.
- Morales G, Carrillo G, Requena JM, Guzman F, Gomez LC, Patarroyo ME y Alonso C (1997). Mapping of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* gp63 protein recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 114 (6):507-516.
- Morales MA, Chicharro C, Ares M, Canavate C, Barker DC y Alvar J (2001). Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 95:104-107.

- Moreira ED Jr, Mendes de Souza VM, Sreenivasan M, Nascimento EG y Pontes de Carvalho L (2004). Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. *Vet Parasitol*, 6:245-252.
- Moreno J y Alvar J (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol*, 18:399-405.
- Moreno J, Nieto J, Masina S, Carrillo E, Canavate C, Cruz I, Chicharro C, Napp S, Reymond C, Stager S, Kaye P, Smith D, Fasel N y Alvar J (2005). Immunization with H1 and HASPB1 *Leishmania* proteins protect dogs against experimental canine leishmaniasis. En: Third World Congress on Leshmaniosis, Palermo-Terrasini, Sicilia, Italia, 10-15 abril 2005.
- Moreno J, Vouldoukis I, Martin V, McGahie D, Cuisinier AM y Gueguen S (2012). Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(6):e1683.
- Morillas F, Benavides, I, González J, Reyes A y Valero A (1985). Découverte de *Leishmania* sp. Dans le *Rattus rattus* de la province de Grènade (Espagne). *Ann Parasitol Hum Comp*, 60:768-770.
- Morillas F, Sanchez Rabasco F, Ocaña J, Martin-Sanchez J, Ocaña-Wihelmi J, Acedo C y Sanchiz-Marin MC (1996). Leishmaniosis in the focus of the Axarquía region, Malaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector. *Parasitol Res*, 82:569-570.
- Muller N, Zimmermann V, Forster U, Bienz M, Gottstein B y Welle M (2003). PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffinembedded skin biopsies: elaboration of a protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. *Vet Parasitol*, 114:223-229.
- Munstermann L (2005). Phlebotomine Sand Flies, the Psychodidae, En: Marquardt, WC (Edit) Biology of disease vectors. Dana Dreibelbis, San Diego, California, USA. Págs 141-151.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR y Saravia NG (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet*, 366:1561-1577.
- Mylonakis ME, Papaioannou N, Saridomichelakis MN, Koutinas AF, Billinis C y Kontos VI (2005). Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Vet Clin Pathol*, 34:243-247.
- Naranjo C, Fondevila D, Leiva M, Roura X y Pena T (2005). Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. *Vet Parasitol*, 133:37-47.
- Neogy A, Vouldoukis J, Silva O, Tselentis Y, Lascombe J, Segalen T, Rzepka D y Monjour L (1992). Serodiagnosis and screening of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Corsica: applicability of a direct agglutination test and immunoblot analysis. *Am J Trop Med Hyg*, 47:772-777.

- Nicolle C y Comte C (1908). Origine canine du Kala-azar. *Bull Soc Pathol Exot*, 1:299-301.
- Nieto CG, Navarrete I, Habela MA, Serrano F y Redondo E (1992). Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol*, 45:33-47.
- Nieto C, García-Alonso M, Requena J, Mirón C, Soto M, Alonso C, Navarrete L (1999). Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 67:117-130.
- Noben-Trauth N, Lira R, Nagase H, Paul WE y Sacks DL (2003). The relative contribution of IL-4 receptor signaling and IL-10 to susceptibility to *Leishmania major*. *J Immunol*, 170(10):5152-5158.
- Nocito I, Serra E y Montero A (2002). Visceral involvement due to *Leishmania mexicana* in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med*, 113:260-262.
- Nogueira FS, Moreira MA, Borja-Cabrera GP, Santos FN, Menz I, Parra LE, Xu Z, Chu HJ, Palatnik-de-Sousa CB y Luvizotto MC (2005). Leishmune vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis: absence of *Leishmania* parasites in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine*, 23:4805-4810.
- Noli C y Auxilia ST (2005). Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet Dermatol*, 16:213-232.
- Noyes H, Chance M, Ponce C, Ponce E y Maingon R (1997). *Leishmania chagasi*: genotypically similar parasites from Honduras cause both visceral and cutaneous leishmaniasis in humans. *Exp Parasitol*, 85:264-273.
- Nunes CM, Lima VM, Paula HB, Perri SH, Andrade AM, Dias FE y Burattini MN (2008). Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol*, 153:19-23.
- Nunes CM, Pires MM, da Silva KM, Assis FD, Gonçalves Filho J y Perri SH (2010). Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Vet Parasitol*, 170:131-133.
- Oliva G, Scalone A, Foglia Manzillo V, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T y Gradoni L (2006). Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J Clin Microbiol*, 44: 1318-1322.
- Oliveira-Neto MP, Grimaldi G, Jr., Momen H, Pacheco RS, Marzochi MC y McMahon Pratt D (1986). Active cutaneous leishmaniasis in Brazil, induced by *Leishmania donovani chagasi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 81:303-309.

- Oliveira-Neto MP, Mattos M, Souza CS, Fernandes O y Pirmez C (1998). Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*, 37:846-849.
- Oliveira AC, Abreu-Silva AL, Lima TB, Silva APC, Reis LF, Barbosa DS y Guerra RMSNC (2006). Soroprevalência da leishmaniose visceral canina no bairro Jardim São Raimundo em São Luís. *Rev Soc Bras Med Trop*, 1:140-143.
- Oliveira AL, Brustoloni YM, Fernandes TD, Dorval ME, Cunha RV y Bóia MN (2009). Severe adverse reactions to meglumine antimoniate in the treatment of visceral leishmaniasis: a report of 13 cases in the southwestern region of Brazil. *Trop Doct*, 39(3):180-182.
- OPS/OMS (Organización Panamericana de Salud) (2006). Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas, Panaftosa, Rio de Janeiro, Brazil. Editado por la Organización Panamericana de la Salud, 152 págs.
- OPS/OMS (Organización Panamericana de Salud) (2009). Experts call for prevention of severe cases of Visceral Leishmaniasis. Foz do Iguazú, Brasil. En: <http://new.paho.org/hq>.
- Ordeix L, Solano-Gallego L, Fondevila D, Ferrer L y Fondati A (2005). Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. *Vet Dermatol*, 16:187-191.
- Otranto D, Paradies P, Sasanelli M, Spinelli R, y Brandonisio O (2004). Rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of canine leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 42:2769-2770.
- Otranto D, Paradies P, Sasanelli M, Leone N, de Caprariis D, Chirico J, Spinelli R, Capelli G y Brandonisio O (2005). Recombinant K39 dipstick immunochromatographic test: a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis. *J Vet Diagn Invest*, 17(1):32-37.
- Otranto D, Paradies P, Lia RP, Latrofa MS, Testini G, Cantacessi C, Mencke N, Galli G, Capelli G, Stanneck D (2007). Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennelled dogs in an endemic area. *Vet Parasitol*, 144:270-278.
- Otranto D, Paradies P, Sasanelli M, Spinelli R y Brandonisio O (2004). Rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of canine leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 42:2769-2770.
- Owens SD, Oakley DA, Marryott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, Newton A, Steurer F, Schantz P y Giger U (2001). Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 219:1076-1083.

- Palacio J, Liste F y Gascon M (1995). Urinary protein/creatinine ratio in the evaluation of renal failure in canine leishmaniasis. *Vet Rec*, 137:567-568.
- Palatnik-de-Sousa CB, Santos WR, França-Silva JC, da Costa RT, Barbosa Reis A, Palatnik M, Mayrink W y Genaro O (2001). Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 65:510-517.
- Palatnik-de-Sousa CB, Melo LMB, Borja-Cabrera GP, Palatnik M y Lavor CC (2004). Improving methods for epidemiological control of canine visceral leishmaniasis based on a mathematical model. Impact on the incidence of the canine and human disease. *An Acad Bras Cien*, 76:583-593.
- Palatnik-de-Sousa CB (2008). Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. Review. *Vaccine*, 26:1709-1724.
- Palatnik-de-Sousa CB y Day MJ (2011). One Health: the Global Challenge of Epidemic and Endemic Leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 4:197.
- Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, Crotti A, Maroli M, Oliva G, Roura X, Zatelli A, Zini E y Canine Leishmaniasis Working Group, Italian Society of Veterinarians of Companion Animals (2010). Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 236(11):1184-1191.
- Papadogiannakis E, Spanakos G, Kontos V, Menounos PG, Tegos N y Vakalis N (2010). Molecular Detection of *Leishmania infantum* in Wild Rodents (*Rattus norvegicus*) in Greece. *Zoonoses Public Health*, 57(7-8):e23-25.
- Paranhos-Silva M, Nascimento EG, Melro MC, Oliveira GG, dos Santos WL, Pontes-de-Carvalho LC y Oliveira-dos-Santos AJ (1998). Cohort study on canine emigration and *Leishmania* infection in an endemic area for American visceral leishmaniasis. Implications for the disease control. *Acta Trop*, 69(1):75-83.
- Pastor-Santiago JA, Chávez-López S, Guzmán-Bracho C, Flisser A y Olivo-Díaz A (2012). American visceral leishmaniasis in Chiapas, Mexico. *Am J Trop Med Hyg*, 86(1):108-114.
- Pennisi MG, Reale S, Giudice SL, Masucci M, Caracappa S, Vitale M y Vitale F (2005). Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Vet Res Commun*, 29 (2):301-303.
- Pena MT, Roura X y Davidson MG (2000). Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993–1998). *Vet Ophthalmol*, 3:35-41.
- Pena MT, Naranjo C, Klauss G, Fondevila D, Leiva M, Roura X, Davidson MG y Dubielzig RR (2008). Histopathological features of ocular leishmaniosis in the dog. *J Comp Pathol*, 138:32-39.

- Persechino A y Oliva G (1986). Autoimmunity associated with leishmaniasis in dogs. *Acta Med Vet*, 75:247-249.
- Petanides TA, Koutinas AF, Mylonakis ME, Day MJ, Saridomichelakis MN, Leontides LS, Mischke R, Diniz P, Breitschwerdt EB, Kritsepi M, Garipidou VA, Koutinas CK y Lekkas S (2008). Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med*, 22:866-872.
- Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G y Ruitenbergh J (1994). Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun*, 62:229-235.
- Poli A, Abramo F, Mancianti F, Nigro M, Pieri S y Bionda A (1991). Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. *Nephron*, 57:444-452.
- Poli A, Abramo F, Barsotti P, Leva S, Gramiccia M, Ludovisi A y Mancianti F (2002). Feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Italy. *Vet Parasitol*, 106(3):181-191.
- Ponce C, Ponce E, Morrison A, Cruz A, Kreutzer R, McMahon-Pratt D y Neva F (1991). *Leishmania donovani chagasi*: new clinical variant of cutaneous leishmaniasis in Honduras. *Lancet*, 337:67-70.
- Porrozzi R, Santos da Costa MV, Teva A, Falqueto A, Ferreira AL, dos Santos CD, Fernandes AP, Gazzinelli RT, Campos-Neto A, y Grimaldi Jr G (2007). Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol*, 14:544-548.
- Pozio E, Gradoni L, Bettini S y Gramiccia M (1981). Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Acta Trop*, 38: 383-393.
- Pumarola M, Brevik L, Badiola J, Vargas A, Domingo M y Ferrer L (1991). Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. *J Comp Pathol*, 105(3):279-286.
- Qu JQ, Zhong L, Masoom-Yasinzai M, Rab M, Aksu HSZ, Reed SG, Chang KP y Gilman-Sachs A (1994). Serodiagnosis of Asian leishmaniasis with recombinant antigen from repetitive domain of a *Leishmania* kinesin. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 88:543-545.
- Quaresma PF, Murta SM, Ferreira Ede C, da Rocha-Lima AC, Xavier AA y Gontijo CM (2009). Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. *Acta Trop*, 111(3):289-294.

- Queiroz PVS, Monteiro GRG, Macedo VPS, Rocha MAC, Batista LMM, Queiroz JW, Jerônimo SMB y Ximenes MFFM (2009). Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. *Res Vet Sci*, 86:267-273.
- Quijada L, Requena JM, Soto M, Gomez LC, Guzman F, Patarroyo ME y Alonso C (1996). Mapping of the linear antigenic determinants of the *Leishmania infantum* hsp70 recognized by leishmaniasis sera. *Immunol Lett*, 52:73-79.
- Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez L y Dye C (1997). The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology*, 115(Pt 2):143-156.
- Quinnell RJ, Kennedy LJ, Barnes A, Courtenay O, Dye C, Garcez LM, Shaw MA, Carter SD, Thomson W y Ollier WE (2003). Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics*, 55:23-28.
- Quinnell RJ y Courtenay O (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 136:1915-1934.
- Rabello A, Orsini M y Disch J (2003). *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann Trop Med Parasitol*, 97(1):17-28.
- Rafati S, Nakhaee A, Taheri T, Taslimi Y, Darabi H, Eravani D, Sanos S, Kaye P, Taghikhani M, Jamshidi S y Rad MA (2005). Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. *Vaccine*, 23:3716-3725.
- Rallis T, Day MJ, Saridomichelakis MN, Adamama-Moraitou KK, Papazoglou L, Fytianou A y Koutinas AF (2005). Chronic hepatitis associated with canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. *J Comp Pathol*, 132:145-152.
- Rangel EF y Vilela ML (2008). *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica*, 24(12):2948-2952.
- Ranque JM, Quilici M y Dunan S (1997). Les leishmanioses de la region provencale. Considerations epidemiologiques et ecologiques. En: Colloques Internationaux du CNRS. Ecologie des leishmanioses. Paris: Centre National de la Recherche Scientifique, 239:285-293.
- Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Guerra LL, Carvalho MG, Mayrink W, Genaro O, Corrêa-Oliveira R y Martins-Filho OA (2006). Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin Exp Immunol*, 146:303-311.

- Reis A, Teixeira-Carvalho A, Vale A, Marques M, Giunchetti R, Mayrink W, Guerra L, Andrade R, Correia-Oliveira R y Martins-Filho O (2006). Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*, 112:102-111.
- Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, Tafuri WL y Correa-Oliveira R (2009). Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 128:87-95.
- Reis AB, Giunchetti RC, Carrillo E, Martins-Filho OA y Moreno J (2010). Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. *Trends Parasitol*, 26(7):341-349.
- Reithinger R y Davies CR (1999). Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am J Trop Med Hyg*, 61(4):530-541.
- Reithinger R, Quinnell RJ, Alexander B y Davies CR (2002). Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: Comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. *J Clin Microbiol*, 40:2352-2356.
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B y Brooker S (2007). Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, 7:581-596.
- Rhalem A, Sahibi H, Guessous-Idrissi N, Lasri S, Natami A, Riyad M y Berrag B (1999). Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*, 81:173-184.
- Ribeiro RR, Moura EP, Pimentel VM, Sampaio WM, Silva SM, Schettini DA, Alves CF, Melo FA, Tafuri WL, Demicheli C, Melo MN, Frézard F y Michalick MS (2008). Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother*, 52:2564-2572.
- Riera C, Fisa R, Udina M, Gállego M y Portus M (2004). Detection of *Leishmania infantum* cryptic infection in asymptomatic blood donors living in an endemic area (Eivissa, Balearic Islands, Spain) by different diagnostic methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 98(2):102-110.
- Rioux JA, Killick-Kendrick R, Leaney AJ, Young CJ, Turner DP, Lanotte G y Bailly M (1979). Ecology of leishmaniasis in the south of France. Canine leishmaniasis: successful experimental transmission from dog to dog by the bite of *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921. *Ann Parasitol Hum Comp*, 54(4):401-407.

- Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P y Perieres J (1990). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp*, 65(3):111-125.
- Robello C. Responsable de la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay. Comunicación personal, 2011.
- Roberts L.S. y Janovi J (1995). *Foundations of Parasitology*, 5ª ed. Brown/McGraw-Hill (Ed.), Dubuque, Iowa, USA.
- Rolão N, Cortes S, Rodrigues O y Campino L (2004). Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by realtime polymerase chain reaction and polymerase chain reactionenzyme-linked immunosorbent assay. *J Parasitol*, 90:1150-1154.
- Romero MH, López MC y Sanchez JA (2009). Búsqueda activa de casos de leishmaniasis visceral zoonótica en población infantil indígena y canina colombiana. *Rev Salud Publica (Bogota)*, 11(6):944-951.
- Romero GA y Boelaert M (2010). Control of visceral leishmaniasis in Latin America-a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*, 19; 4(1):e584.
- Rondon FC, Bevilaqua CM, Franke CR, Barros RS, Oliveira FR, Alcântara AC y Diniz AT (2008). Cross-sectional serological study of canine *Leishmania* infection in Fortaleza, Ceará state, Brazil. *Vet Parasitol*, 155:24-31.
- Rosário E, Genaro O, Francisca-Silva J, Costa R, Mayrink W, Reis A y Carneiro M (2005). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100:197-203.
- Rosati S, Ortoffi M, Profiti M, Mannelli A, Mignone W, Bollo E y Gradoni L (2003). Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant *Leishmania* antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 10:1153-1156.
- Rosenthal PJ, Chaisson RE, Hadley WK y Leech JH (1988). Rectal leishmaniasis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med*, 84:307-309.
- Ross R (1903). Note on the bodies recently described by Leishman y Donovan. *Br Med J*, 2(2237):1261-1262.
- Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Duncan RB, Jr., Waki K, Chang KP y Lindsay DS (2003a). Emergence of zoonotic canine leishmaniasis in the United States: isolation and immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* from foxhounds from Virginia. *J Eukaryot Microbiol*, 50:691-693.
- Rosypal AC, Zajac AM y Lindsay DS (2003b). Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 33:921-937.

- Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Frank G y Lindsay DS (2005a). Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *J Parasitol*, 91(4):970-972.
- Rosypal AC, Troy GC, Duncan RB, Zajac AM, Lindsay DS (2005b). Utility of diagnostic tests used in diagnosis of infection in dogs experimentally inoculated with a North American isolate of *Leishmania infantum*. *J Vet Intern Med*, 19(6): 802-809.
- Rotureau B (2006). Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan ecoregion complex. *Am J Trop Med Hyg*, 74(1):87-96.
- Roura X, Sanchez A y Ferrer L (1999). Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Vet Rec*, 144:262-264.
- Sacks DL, Lal SL, Shrivastava SN, Blackwell J y Neva FA (1987). An analysis of T cell responsiveness in Indian kala-azar. *J Immunol*, 1:138(3):908-913.
- Saldarriaga OA, Travi BL, Park W, Perez LE y Melby PC (2006). Immunogenicity of a multicomponent DNA vaccine against visceral leishmaniasis in dogs. *Vaccine*, 24:1928-1940.
- Sadlova J, Yeo M, Seblova V, Lewis MD, Mauricio I, Volf P y Miles MA (2011). Visualisation of Mem Inst Oswaldo Cruz, *Leishmania donovani* fluorescent hybrids during early stage development in the sand fly vector. *PLoS One*, 6(5):e19851.
- Salomón OD (1998). Vectores de Leishmaniosis. En: Seijo AC, Larghi OP, Espinosa MO, Rivas M, Sabattini M (Eds). Zoonosis y Enfermedades Emergentes. *Buenos Aires: Asoc Arg Zoonosis*, págs 2264-2267.
- Salomón OD, Sosa Estani S, Rossi GC y Spinelli GR (2001). Presencia de *Lutzomyia longipalpis* y situación de la leishmaniasis visceral en Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, 61:174-178.
- Salomón OD, Sinagra A, Nevot MC, Barberian G, Paulin P, Estevez J, Riarte A y Estevez J (2008). First visceral leishmaniasis focus in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103:109-111.
- Salomón OD, Quintana MG, Bruno MR, Quiriconi RV y Cabral V (2009). Visceral leishmaniasis in border areas: clustered distribution of phlebotomine sand flies in Clorinda, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104:801-804.
- Salomón OD, Basmajdian Y, Fernández MS y Santini MS (2011). *Lutzomyia longipalpis* in Uruguay: the first report and the potential of visceral leishmaniasis transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106(3):381-382.
- Sanchez-Robert E, Altet L, Sanchez A y Fancino O (2005). Polymorphism of Slc11 a1 (Nramp1) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. *J Hered*, 96:755-758.

- Sanchez-Robert E, Altet L, Utzet-Sadurni M, Giger U, Sanchez A y Francino O (2008): Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. *Vet Res*, 39(3):36.
- Santos FN, Borja-Cabrera GP, Miyashiro LM, Grechi J, Reis AB, Moreira MA, Martins Filho OA, Luvizotto MC, Menz I, Pessôa LM, Gonçalves PR, Palatnik M, Palatnik-de-Sousa CB (2007). Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune vaccine. *Vaccine*, 14;25(33):6176-6190.
- Santos JM, Dantas-Torres F, Mattos MR, Lino FR, Andrade LS, Souza RC, Brito FL, Brito ME, Brandão-Filho SP y Simões-Mattos L (2010). Prevalence of anti-*Leishmania* spp antibodies in dogs from Garanhuns, in the middle scrub zone (Agreste) of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop*, 43:41-45.
- Santos-Gomes G.M., Rosa R., Leandro C., Cortes S., Romao P. y Silveira H. (2002). Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol*, 88:21-30.
- Saraiva EM, de Figueiredo Barbosa A, Santos FN, Borja-Cabrera GP, Nico D, Souza LO, de Oliveira Mendes-Aguiar C, de Souza EP, Fampa P, Parra LE, Menz I, Dias JrJG, de Oliveira SM y Palatnikde-Sousa CB (2006). The FML-vaccine (Leishmune) against canine visceral leishmaniasis: a transmission blocking vaccine. *Vaccine*, 24:2423-2431.
- Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS, Koutinas AF, Billinis C y Kontos VI (2005). Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *Am J Trop Med Hyg*, 73:82-86.
- Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, Mignone W, Turilli C, Mondesire RR, Simpson D, Donoghue AR, Frank GR y Gradoni L (2002). Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet Parasitol*, 104:275-285.
- Schallig HD, Canto-Cavalheiro M y da Silva ES (2002a). Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(7):1015-1018.
- Schallig HD, Schoone GJ, Beijer EG, Kroon CC, Hommers M, Ozbel Y, Ozensoy S, da Silva ES, Cardoso LM y da Silva ED (2002b). Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs. *Vet Parasitol*, 109(1-2):1-8.
- Schallig HD, Cardoso L, Hommers M, Kroon N, Belling G, Rodrigues M, Semião-Santos SJ y Vetter H (2004). Development of a dipstick assay for detection of *Leishmania*-specific canine antibodies. *J Clin Microbiol*, 42(1):193-197.

- Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W y Jaffe CL (2003). PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 47:349-358.
- Shao QF (1982). Surveillance of kala-azar following preliminary eradication. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, 3:35-37.
- Sharma U y Singh S (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis*, 45(4):255-272.
- Shaw MH, Freeman GJ, Scott MF, Fox BA, Bzik DJ, Belkaid Y y Yap GS (2006). Tyk2 negatively regulates adaptive Th1 immunity by mediating IL-10 signaling and promoting IFN-gamma-dependent IL-10 reactivation. *J Immunol*, 176:7263-7271.
- Shaw J (2007). The leishmaniasis--survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102(5):541-547.
- Sideris V, Karagouni E, Papadopoulou G, Garifallou A y Dotsika E (1996). Canine visceral leishmaniasis in the greater Athens area, Greece. *Parasite*, 3:125-130.
- Sideris V, Papadopoulou G, Dotsika E y Karagouni E (1999). Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece. *Eur J Epidemiol*, 15(3):271-276.
- Silva ES, Gontijo CM, Pirmez C, Fernandes O y Brazil RP (2001). Short report: detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction on blood samples from dogs with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 65:896-898.
- Silva EA, Andreotti R, Dias ES, Barros JC y Brazuna JC (2008a). Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Exp Parasitol*, 119(3):343-348.
- Silva MR, Marques MJ, Romanha AJ, Santa-Rosa IC, Carneiro CM y Reis AB (2008b). Autochthonous canine visceral leishmaniasis in a non-endemic area: Bom Sucesso, Minas Gerais State, Brazil. *Cad Saude Publica*, 24(2):281-286.
- Silva FL, Oliveira RG, Silva TM, Xavier MN, Nascimento EF y Santos RL (2009). Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 160:55-59.
- Simpson L y Da Silva A (1971). Isolation and characterization of kinetoplast DNA from *Leishmania tarentolae*. *J Mol Biol*, 56:443-473.
- Sinagra A, Riarte A, Luna C, Campanini A y Segura L (1997). *Leishmania (Viannia) braziliensis*, biological behavior in golden hamsters isolates from argentine patients. *Am J Trop Med Hyg*, 57: 115-118.
- Singh R, Das RK y Sharma SK (2001). Resistance of sandflies to DDT in Kala-azar endemic districts of Bihar, India. *Bull World Health Organ*, 79(8):793.
- Singh S, Dey A y Sivakumar R (2005). Applications of molecular methods for *Leishmania* control. *Expert Rev Mol Diagn*, 5:251-265.

- Slappendel R.J. (1988). Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands. *Vet Q*, 10:1-16.
- Soares RP y Turco SJ (2003). *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *An Acad Bras Cienc*, 5(3):301-330.
- Sobrino R, Ferroglio E, Oleaga A, Romano A, Millan J, Revilla M, Arnal MC, Trisciuglio A y Gortazar C (2008). Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet Parasitol*, 155:198-203.
- Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J y Ferrer L (2000). The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol*, 90:37-45.
- Solano-Gallego L, Riera C, Roura X, Iniesta L, Gallego M, Valladares JE, Fisa R, Castillejo S, Alberola J, Ferrer L, Arboix M y Portus M (2001). *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Vet Parasitol*, 96:265-276.
- Solano-Gallego L, Fernandez-Bellon H, Morell P, Fondevila D, Alberola J, Ramis A, Ferrer L (2004). Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J Comp Pathol*, 130:7-12.
- Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G y Baneth G (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 165:1-18.
- Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G, The LeishVet Group (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasit Vectors*, 4:86.
- Solbach W y Laskay T (2000). The host response to *Leishmania* infection. *Advances in Immunology*, 74:275-317.
- Soto M, Requena JM, Quijada L, Garcia M, Guzman F, Patarroyo ME y Alonso C, (1995a). Mapping of the linear antigenic determinants from the *Leishmania infantum* histone H2A recognized by sera from dogs with leishmaniasis. *Immunol Lett*, 48:209-214.
- Soto M, Requena JM, Quijada L, Angel SO, Gomez LC, Guzman F, Patarroyo ME y Alonso C (1995b). During active viscerocutaneous leishmaniasis the anti-P2 humoral response is specifically triggered by the parasite P proteins. *Clin Exp Immunol*, 100:246-252.
- Soto M, Requena JM, Quijada L, Gomez LC, Guzman F, Patarroyo ME y Alonso C (1996). Characterization of the antigenic determinants of the *Leishmania infantum* histone H3 recognized by antibodies elicited during canine visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*, 106:454-461.

- Soto M., Requena J.M., Quijada L. y Alonso C. (1998). Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 36: 58-63.
- Soto M, Requena JM, Quijada L, Perez MJ, Nieto CG, Guzman F, Patarroyo ME y Alonso C (1999). Antigenicity of the *Leishmania infantum* histones H2B and H4 during canine viscerocutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*, 115:342-349.
- Spinelli GR, Rossi GC y Rodríguez EA (1999). Further notes on Phlebotominae from Argentina. *Rev Soc Entomol Argentina*, 58:197-200.
- Sundar S, Reed SSG, Singh VP, Kumar PSK y Murray HW (1998). Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. *Lancet* 351:563-565.
- Symmers W S (1960). Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. *Lancet*, 16:127-132.
- Tabar MD, Roura X, Francino O, Altet L y Ruiz de Gopegui R (2008). Detection of *Leishmania infantum* by real-time PCR in a canine blood bank. *J Small Anim Pract*, 49:325-328.
- Teixeira C, Gomes R, Collin N, Reynoso D, Jochim R, Oliveira F, Seitz A, Elnaiem DE, Caldas A, de Souza AP, Brodskyn CI, de Oliveira CI, Mendonca I, Costa CH, Volf P, Barral A, Kamhawi S y Valenzuela JG (2010). Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum chagasi* in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis*, 23;4(3):e638.
- Tesh RB (1995). Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am J Trop Med Hyg*, 52:287-292.
- Tolezano JE, Uliana SR, Taniguchi HH, Araújo MF, Barbosa JA, Barbosa JE, Floeter-Winter LM y Shaw JJ (2007). The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol*, 149(3-4):280-284.
- Torno O, Visciarelli E y Prat MI (1995). Leishmaniosis tegumentaria Americana en la Provincia de Santiago del Estero, Argentina. *Rev As Med Bahía Blanca*, 1:20-27.
- Torrice F, Parrado R, Castro R, Marquez CJ, Torrico MC Solano M, Reithinger R y García AL (2009). Co-Infection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and HIV: report of a case of mucosal leishmaniasis in Cochabamba, Bolivia. *Am J Trop Med Hyg*, 81(4):555-558.
- Townson H, Nathan MB, Zaim M, Guillet P, Manga L, Bos R y Kindhauser M (2005). Exploiting the potential of vector control for disease prevention. *Bull World Health Organ*, 83(12):942-947.
- Toz SO, Chang KP, Ozbel Y y Alkan MZ (2004). Diagnostic value of rK39 dipstick in zoonotic visceral leishmaniasis in Turkey. *J Parasitol*, 90:1484-1486.

- Travi BL, Tabares CJ, Cadena H, Ferro C y Osorio Y (2001). Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am J Trop Med Hyg*, 64:119-124.
- Troncarelli MZ, Camargo JB, Machado JG, Lucheis SB y Langoni H (2009). *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol*, 164(2-4):118-123
- Tuon FF, Neto VA y Amato VS (2008). *Leishmania*: origin, evolution and future since the Precambrian. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 54:158-166.
- Uttinger J y Keiser J (2006). Urbanization and tropical health-then and now. *Annals of Trop Med & Parasitol*, 100(5-6):517-533.
- Valenzuela JG, Belkaid Y, Garfield MK, Méndez S, Kamhawi S, Rowton ED, Sacks DL y Ribeiro JM, 2001, Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *J Exp Med*, 194:331-342.
- Vamvakidis CD, Koutinas AF, Kanakoudis G, Georgiadis G y Saridomichelakis M (2000). Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Vet Rec*, 146:698-703.
- van den Berg H, Zaim M, Yadav RS, Soares A, Ameneshewa B, Mnzava A, Hii J, Dash AP y Ejov M (2012). Global trends in the use of insecticides to control vector-borne diseases. *Environ Health Perspect*, 120(4):577-582.
- van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC y Ebeling SB (1992). Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol*, 51(1):133-142.
- Velez ID, Travi BL, Gallego J, Palma GI y Agudelo S (1995). Ecoepidemiological evaluation of visceral leishmaniasis in the native Zenu community of San Andres de Sotavento Cordoba: first step for its control. *Rev Col Entomol*, 21(3):111-122.
- Vercammen F., Fernandez-Perez F.J., del Amo C. y Alunda J.M. (2002). Follow-up of *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and Western blot. *Acta Trop*, 84:175-181.
- Vianna VL, Takiya CM y de Brito-Gitirana L (2002). Histopathologic analysis of hamster hepatocytes submitted to experimental infection with *Leishmania donovani*. *Parasitol Res*, 88(9):829-386.
- Volf P, Hostomska J y Rohousova I (2008). Molecular crosstalks in *Leishmania*-sandfly-host relationships. *Parasite*, 15(3):237-243.

- Volpini AC, Passos VM, Oliveira GC y Romanha AJ (2004). PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop*, 90(1):31-37.
- Vouldoukis I, Drapier JC, Nüssler AK, Tselentis Y, Da Silva OA, Gentilini M, Mossalayi DM, Monjour L y Dugas B (1996). Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. *Antimicrob Agents Chemother*, 40(1):253-256.
- Werneck GL, Costa CHN, Walker AM, David JR, Wand M y Maguire JH (2007). Multilevel modeling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. *Epidemiol Infect*, 135:195-201.
- Werneck GL (2008). Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. *Cad Saúde Pública*, 24(12):2937-2940.
- WHO (World Health Organization) (1984). The Leishmaniasis. Technical report series 701. World Health Organization (Edit.). Ginebra, Suiza, 140 págs.
- WHO (World Health Organization) (1990). Control of Leishmaniasis. Technical Report Series, WHO (Edit.), Ginebra, Suiza, nº 793.
- WHO (World Health Organization) (1996). Manual on visceral leishmaniasis control. Geneva, WHO/LEISH/9640.
- WHO (World Health Organization) (2002). Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. *Wkly Epidemiol Rec*, Ginebra, Suiza, 44:365-370.
- WHO (World Health Organization) (2010). Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Technical report series, WHO (Edit.), Ginebra, Suiza, nº 949.
- WHO (World Health Organization) (2011). UNICEF/UNDP/World Bank/World Health Organization Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Visceral leishmaniasis rapid diagnostic test performance. TDR.
- Wilcox, B.A. and Gubler, D.J. (2005). Disease ecology and the global emergence of zoonotic pathogens. *Environmental Health & Preventive Medicine*, 10(5), 263-272.
- Wilde H, Di Carlo FC y Pessat OAN (1956). Kala- Azar (Leishmaniosis visceral) autóctono. Su tratamiento con derivados antimoniales. *El Diario Médico*, 84:2629-2636.
- Woerly V, Maynard L, Sanquer A y Eun HM (2009). Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. *Parasitol Res*, 105:463-469.
- Wolschrijn CF, Meyer HP, Hazewinkel HA y Wolvekamp WT(1996). Destructive polyarthritis in a dog with leishmaniasis. *J Small Anim Pract*, 37:601-603.

- Wright JH (1903). Protozoa in a Case of Tropical Ulcer ("Delhi Sore"). *J Med Res*, 10(3):472-482.
- Zaffaroni E, Rubaudo L, Lanfranchi P y Mignone W (1999). Epidemiological patterns of canine leishmaniasis in Western Liguria (Italy). *Vet Parasitol*, 81:11-19.
- Zaghloul IY y Al-Jasser M (2004). Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of antimony in hamsters. *Ann Trop Med Parasitol*, 98:793-800.
- Zambrano-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero JC y Ortiz-Ortiz L (2002). How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol*, 18(6):272-278.
- Zatelli A, Borgarelli M, Santilli R, Bonfanti U, Nigrisoli E, Zanatta R, Tarducci A y Guarraci A (2003). Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. *Am J Vet Res*, 64:558-561.
- Zeledón R, Macaya G, Ponce C, Chaves F, Murillo J et al (1982). Cutaneous leishmaniasis in Honduras, Central America. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 76(2):276-277.
- Zeledón R (1991). Cutaneous leishmaniasis and *Leishmania infantum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 85(4):557.
- Zerpa O, Ulrich M, Negrón E, Rodríguez N, Centeno M, Rodríguez V, Barrios RM, Belizario D, Reed S y Convit J (2000). Canine visceral leishmaniasis on Margarita island (Nueva Esparta, Venezuela). *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 5:484-487.
- Zerpa O, Pratlong F, Ulrich M y Convit J (2001). Isolation of *Leishmania infantum*, Zymodeme MON-1 from Canine and Human Visceral Leishmaniasis on Margarita Island, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96(7):901-902.
- Zhi-Biao X (1989). Present situation of visceral leishmaniasis in China. *Parasitol Today*, 5:224-228.
- Zijlstra EE y el-Hassan AM (2001). Leishmaniasis in Sudan. Visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 95 (1):S27-58.
- Zijlstra EE, Musa AM, Khalil EA, El-Hassan IM y el-Hassan AM (2003). Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, 3:87-98.
- Zivicnjak T, Martinkovic F, Marinculic A, Mrljak V, Kucer N, Matijatko V, Mihaljevic Z y Baric-Rafaj R (2005). A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniasis among apparently healthy dogs in Croatia. *Vet Parasitol*, 131:35-43.
- Zulueta AM, Villarroel E, Rodriguez N, Feliciangeli MD, Mazzarri M, Reyes O, Rodriguez V, Centeno M, Barrios RM y Ulrich M (1999). Epidemiologic aspects of American visceral leishmaniasis in an endemic focus in Eastern Venezuela. *Am J Trop Med Hyg*, 61(6):945-950.

Zwingenberger K, Harms G, Pedrosa C, Omena S, Sandkamp B y Neifer S (1990).
Determinants of the immune response in visceral leishmaniasis: evidence for
predominance of endogenous interleukin 4 over interferon-gamma production.
Clin Immunol Immunopathol, 57(2):242-9.

